

**Charakterisierung genetischer und epigenetischer  
Veränderungen von Medulloblastomzellen  
mittels MLPA-Analyse**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor medicinae“ (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Denise Feierabend  
geboren am 27.10.1987 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Rolf Kalff, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst, Jena
3. PD Dr. med. habil. Susanne A. Kuhn, Potsdam

Datum der Verteidigung: 03.12.2013

**Abkürzungsverzeichnis**

|         |   |
|---------|---|
| Abb.    | Abbildung   |
| AG      | Arbeitsgruppe   |
| bp      | Basenpaare  |
| bzgl.   | bezüglich   |
| bzw.    | beziehungsweise   |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure  |
| et al.  | et alia   |
| g       | Gramm   |
| Gy      | Grey  |
| h       | Stunde  |
| HE      | Hämatoxylin-Eosin   |
| kb      | Kilobasen   |
| l       | Liter   |
| Max     | Maximum   |
| Mb      | Megabasen   |
| MB      | Medulloblastom  |
| $\mu$   | Mikro ( $\times 10^{-6}$ )  |
| m       | Milli ( $\times 10^{-3}$ )  |
| Min     | Minimum   |
| MLPA    | multiplex ligation-dependent probe amplification                      |
| MS-MLPA | methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification |
| n       | Nano ( $\times 10^{-9}$ )   |
| p       | Signifikanz   |
| Pat.    | Patient   |
| PCR     | Polymerasekettenreaktion  |
| PNET    | primitiver neuroektodermaler Tumor                                    |
| Tab.    | Tabelle   |
| TNF     | Tumornekrosefaktor  |
| TSG     | Tumorsuppressorgen  |
| WHO     | World Health Organization   |
| ZNS     | Zentralnervensystem   |

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <u>Zusammenfassung</u> .....  | 1  |
| <u>1 Einleitung</u> .....   | 3  |
| 1.1 <i>Medulloblastome</i> .....  | 3  |
| 1.1.1 Makro- und mikroskopische Aspekte .....                           | 3  |
| 1.1.2 Therapieprinzipien & Prognose .....                               | 6  |
| 1.2 <i>Molekulargenetische Eigenschaften von Medulloblastomen</i> ..... | 7  |
| 1.3 <i>Onkogene</i> .....   | 9  |
| 1.3.1 Zelluläre Funktion und Bedeutung von Onkogenen .....              | 9  |
| 1.3.2 Ausgewählte Onkogene .....  | 10 |
| 1.3.2.1 FGF4 .....  | 10 |
| 1.3.2.2 IGFBP5 .....  | 11 |
| 1.3.2.3 PPM1D .....   | 11 |
| 1.4 <i>Tumorsuppressorgene</i> .....                                    | 12 |
| 1.4.1 Zelluläre Funktion und Bedeutung von Tumorsuppressorgenen .....   | 12 |
| 1.4.2 Ausgewählte Tumorsuppressorgene .....                             | 13 |
| 1.4.2.1 ASC .....   | 13 |
| 1.4.2.2 CASP8 .....   | 14 |
| 1.4.2.3 GATA5 .....   | 15 |
| 1.4.2.4 MGMT .....  | 15 |
| 1.4.2.5 MSH6 .....  | 16 |
| 1.4.2.6 RASSF1A .....   | 17 |
| 1.5 <i>Ausgewählte Aberrationsmechanismen</i> .....                     | 18 |
| 1.6 <i>Methoden zur Erfassung genetischer Aberrationen</i> .....        | 19 |
| 1.6.1 Standardverfahren in der Übersicht .....                          | 19 |
| 1.6.2 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) .....     | 20 |
| 1.6.2.1 Prinzip des MLPA-Verfahrens .....                               | 20 |
| 1.6.2.2 Prinzip des MS-MLPA-Verfahrens .....                            | 21 |
| <u>2 Zielstellung</u> .....   | 23 |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>3</b> | <b><u>Material und Methoden</u></b>                       | <b>24</b> |
| 3.1      | <i>Angaben zum Probenumfang</i>                           | 24        |
| 3.2      | <i>Erhebung klinischer Daten</i>                          | 26        |
| 3.3      | <i>Aufbereitung der Tumorproben</i>                       | 27        |
| 3.3.1    | Anfertigung histologischer Schnittpräparate               | 27        |
| 3.3.2    | DNA-Isolierung des Probenmaterials                        | 27        |
| 3.4      | <i>MLPA-Verfahren</i>                                     | 28        |
| 3.4.1    | Verwendeter Onkogen-Kit                                   | 28        |
| 3.3.2    | Verwendete Tumorsuppressorgen-Kits                        | 29        |
| 3.5      | <i>Densitometrische Auswertung</i>                        | 32        |
| 3.6      | <i>Auswertung der Aberrationen</i>                        | 33        |
| 3.7      | <i>Statistische Beurteilung</i>                           | 33        |
| <b>4</b> | <b><u>Ergebnisse</u></b>                                  | <b>35</b> |
| 4.1      | <i>Histopathologische Auswertung</i>                      | 35        |
| 4.2      | <i>Qualität der Tumorproben</i>                           | 36        |
| 4.2.1    | Konzentrationsmessung                                     | 36        |
| 4.2.2    | Gelelektrophoretische Auswertung                          | 38        |
| 4.3      | <i>Visualisierung der MLPA-Reaktion</i>                   | 39        |
| 4.4      | <i>Auswertung von Kopienzahländerungen</i>                | 46        |
| 4.4.1    | Analyse des Amplifikationsstatus                          | 47        |
| 4.4.2    | Analyse des Deletionsstatus                               | 49        |
| 4.4.3    | Kopienzahländerungen in der Übersicht                     | 51        |
| 4.5      | <i>Auswertung der Promotormethylierungen</i>              | 55        |
| 4.5.1    | Analyse des Methylierungsstatus                           | 55        |
| 4.5.2    | Methylierungen in der Übersicht                           | 57        |
| 4.6      | <i>Genaberrationen in Abhängigkeit vom Probenmaterial</i> | 59        |
| 4.7      | <i>Häufig involvierte Gene</i>                            | 59        |
| 4.8      | <i>Korrelation des Genstatus zum klinischem Bild</i>      | 60        |
| 4.8.1    | Einfluss von Kopienzahländerungen                         | 61        |
| 4.8.2    | Einfluss von Promotormethylierungen                       | 62        |
| 4.8.3    | Einfluss einzelner Genaberrationen                        | 63        |
| 4.8.4    | Untersuchung von Einzelproben                             | 66        |

|   |    |
|---|----|
| <u>5 Diskussion</u> .....   | 68 |
| 5.1 <i>Einordnung des Studiendesigns</i> .....                            | 68 |
| 5.2 <i>Evaluierung angewandter Methoden</i> .....                         | 70 |
| 5.3 <i>Möglichkeiten und Grenzen des MLPA-Verfahrens</i> .....            | 73 |
| 5.3.1 Vorteile der Untersuchungsmethode .....                             | 73 |
| 5.3.2 Nachteile der Untersuchungsmethode .....                            | 74 |
| 5.4 <i>Aussagekraft der Probenmaterialien für Genuntersuchungen</i> ..... | 75 |
| 5.5 <i>Wertung der Aberrationen in Medulloblastomzellen</i> .....         | 78 |
| 5.5.1 Kopienzahländerungen .....  | 78 |
| 5.5.2 Promotormethylierungen .....  | 80 |
| 5.6 <i>Betrachtung häufig involvierter Gene</i> .....                     | 81 |
| 5.6.1 Ausgewählte Onkogene .....  | 81 |
| 5.6.1.1 FGF4 .....  | 81 |
| 5.6.1.2 IGFBP5 .....  | 82 |
| 5.6.1.3 PPM1D .....   | 83 |
| 5.6.2 Ausgewählte Tumorsuppressorgene .....                               | 84 |
| 5.6.2.1 ASC .....   | 84 |
| 5.6.2.2 CASP8 .....   | 85 |
| 5.6.2.3 GATA5 .....   | 87 |
| 5.6.2.4 MGMT .....  | 88 |
| 5.6.2.5 MSH6 .....  | 90 |
| 5.6.2.6 RASSF1A .....   | 91 |
| 5.7 <i>Risikostratifizierung von Medulloblastomen</i> .....               | 92 |
| 5.8 <i>Ausblick</i> .....   | 93 |
| <u>6 Schlussfolgerung</u> .....   | 96 |
| <u>7 Literatur- und Quellenverzeichnis</u>                                |    |
| <u>8 Anhang</u>   |    |
| Votum der Ethikkommission   |    |
| Übersicht analysierter Gene   |    |
| Danksagung  |    |
| Ehrenwörtliche Erklärung  |    |

## Zusammenfassung

Die Charakterisierung von Tumorzellen wird zunehmend durch molekularbiologische Untersuchungsverfahren bereichert. Sie ermöglichen neue Erkenntnisse hinsichtlich der Ätiologie und Progression maligner Erkrankungen. Zudem schafft die Erfassung genetischer und epigenetischer Veränderungen neue diagnostische und prognostische Perspektiven. Sowohl die Amplifikation von Onkogenen als auch die Deletion oder Promotorhypermethylierung von Tumorsuppressorgenen scheinen eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese zu spielen. Die MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) stellt ein Analyseverfahren dar, welches die simultane Detektion von Kopienzahländerungen im Multiplex-Ansatz ermöglicht. Durch eine Erweiterung der Methodik, die MS-MLPA (*methylation-specific-MLPA*), können darüber hinaus Promotormethylierungen von TSGs erfasst werden. Im Vergleich zu etablierten Nachweismethoden zeichnet sich die MLPA durch eine einfache, schnelle Anwendung und einen minimalen Probenverbrauch aus.

In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Aberrationen von Medulloblastomzellen mithilfe des MLPA- und des MS-MLPA-Verfahrens erfasst und analysiert. Hierfür standen insgesamt 25 Medulloblastomproben, darunter 8 Paraffin-eingebettete und 12 kryokonservierte Exemplare sowie 5 aufgearbeitete DNA-Proben aus Medulloblastom-Zellkulturlinien, zur Verfügung. Unter Verwendung dreier Probenkits (Firma MRC Holland) konnten 77 verschiedene Gene auf ihren Kopienzahlstatus sowie 33 Tumorsuppressorgene auf Hypermethylierungen der Promotorregion untersucht werden.

Zunächst wurden aus den vorliegenden Paraffinblöcken mikroskopische Schnittbildpräparate angefertigt, anhand derer die Qualität der Proben histopathologisch beurteilt werden konnte. Anschließend wurde die DNA der Primärtumore mithilfe eines kommerziellen Kits (Firma QIAGEN) isoliert und hinsichtlich Qualität und Quantität gelelektrophoretisch sowie photometrisch bewertet. Die darauf folgenden MLPA-Analysen wurden mithilfe eines auf Herstellerempfehlungen beruhenden Protokolls durchgeführt.

Die Analyse des Kopienzahl- und Methylierungsstatus der Medulloblastomproben konnte 256 Amplifikationen und 237 Deletionen (bei 1847 Datenpunkten) sowie 122 (von 825 möglichen) Genmethylierungen herausstellen. Der Vergleich der einzelnen Probengruppen erbrachte signifikante Unterschiede des Aberrationsverhaltens von Primärtumoren zu humanen Medulloblastomzelllinien. Während die Proben der Zellkulturlinien durch ihren Reichtum an Kopienzahlveränderungen imponierten, trugen die primären Tumore den

höheren Anteil an Promotorhypermethylierungen. Die Beleuchtung häufig involvierter Gene bestätigte einige bereits bekannte Aberrationen, was die Aussagekraft des MLPA-Verfahrens unterstreichen konnte. Beispielsweise wurden Amplifikationen der Onkogene CTNNB1 und PPM1D nachgewiesen. Neben tumorspezifischen Hypermethylierungen der Tumorsuppressorgene CASP8 und RASSF1A konnten auch epigenetische Veränderungen von MGMT und MSH6 festgehalten werden. Gleichzeitig wurden neue, interessante Mutationen vermerkt, wie die Onkogenamplifikationen von FGF4 sowie IGFBP5 oder die Deletion der TSGs GATA5 und ASC. Für letzteres konnten außerdem Promotorhypermethylierungen aufgezeigt werden. Des Weiteren konnte ein Einfluss des Zugewinns oder Verlusts größerer chromosomaler Abschnitte, z.B. von Chromosom 10 und 17, auf Genaberrationen vermutet werden.

Die Korrelation der Analyseergebnisse mit klinischen Daten konnte zeigen, dass ein erhöhter Anteil an Kopienzahländerungen mit einem positiven Tumorzellnachweis im Liquor assoziiert war. Daneben ergab sich ein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen erhobenen Promotormethylierungen und dem histopathologischen Nachweis von Nekrosen. Auch die klinische Korrelation häufig involvierter Gene erbrachte interessante Schlussfolgerungen. Beispielsweise wurden Amplifikationen des Onkogens PPM1D mit immunhistochemischen Parametern (NSE- und GFAP-Expression), welche in Medulloblastomen nachweisbar sind, in Zusammenhang gebracht. Für Promotormethylierungen des Tumorsuppressorgens TP53 konnte ein Trend zur Rezidivausbildung vermerkt werden. Diese Ergebnisse deuteten auf den Einfluss genetischer Mutationen auf das makro- und mikroskopische Erscheinungsbild von Medulloblastomen hin.

Ein Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien (Paraffin-eingebettete und kryokonservierte Exemplare sowie Proben kultivierter Zelllinien) bzw. deren Fixierungsmethoden offenbarte, dass Unterschiede in deren Aussagekraft für genetische und epigenetische Untersuchungen bestanden. Kryokonservate konnten aufgrund ihrer annehmbaren Validität als bevorzugte Materialgruppe herausgestellt werden.

Die Erfassung genetischer und epigenetischer Veränderungen von Medulloblastomen, für die die vorliegende Arbeit neue Ansatzpunkte aufgezeigt hat, sollte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein. Damit könnte nicht nur ein verbessertes Verständnis der Tumorbiologie geschaffen werden, sondern auch die Frage nach einer klinischen Relevanz für zukünftige Diagnostik und Prognostik sowie die Erschließung neuer therapeutischer Möglichkeiten geklärt werden.



## 1 Einleitung

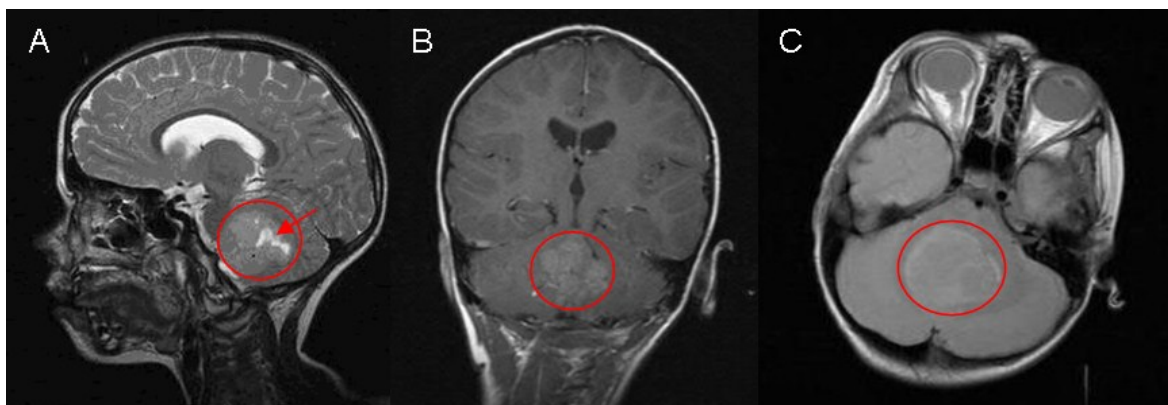
### *1.1 Medulloblastome*

Medulloblastome (MB) stellen mit etwa 20% die häufigsten bösartigen Hirntumore im Kindesalter dar und treten mit einer jährlichen Inzidenz von 5/1.000 000 Kinder auf [Giangaspero *et al.* 2007, Pomeroy *and* Cho 2011]. Der Altersgipfel der Erkrankten liegt zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr. In 65% der Fälle sind männliche Patienten betroffen. Das Medulloblastom wird nach den Kriterien der WHO einem Grad IV zugeordnet [Giangaspero *et al.* 2007]. Die maligne Neoplasie geht aus embryonalen Zellen des Cerebellums hervor und ist vornehmlich in der Vermisregion des Kleinhirns sowie dem Dach des IV. Ventrikels zu finden. Auch eine Beteiligung der Kleinhirnhemisphären und des Hirnstamms ist möglich [Fruehwald-Pallamar *et al.* 2011]. Aufgrund der häufigen Ausbildung eines Okklusionshydrocephalus durch Verlegung des inneren Liquorsystems zeigt sich meist eine rasch progrediente Klinik mit entsprechender Hirndrucksymptomatik, Ataxie sowie Hirnnervenausfällen [Collins 2004].

#### 1.1.1 Makro- und mikroskopische Aspekte

Medulloblastome stellen sich makroskopisch als unscharf begrenzte, grau-weißliche Tumore dar [Giangaspero *et al.* 2007]. Innerhalb der Geschwulste können Zysten, Hämorrhagien, Kalzifizierungen und Nekrosen auftreten [Fruehwald-Pallamar *et al.* 2011]. Medulloblastome zeigen häufig eine leptomeningeale, zuckergussartige Infiltration und neigen zur Bildung spinaler Abtropfmetastasen [Giangaspero *et al.* 2007]. In Computertomographien und Magnetresonanzbildern (MRI) imponieren MB als solide, intensiv und inhomogen Kontrastmittel-aufnehmende Raumforderungen (siehe Abb. 1) [Fruehwald-Pallamar *et al.* 2011, Khatua *et al.* 2012].

Ein Staging des embryonalen Tumors hinsichtlich Morphologie und Metastasierung ist, wie bei allen Neoplasien des zentralen Nervensystems, unüblich. Jedoch gab es in der Vergangenheit den Versuch einer Stadieneinteilung durch Chang *et al.*, welche als Grundlage eines operativen und radiotherapeutischen Managements dienen sollte (siehe Tab. 1) [Chang *et al.* 1969]. Allerdings wird diese heutzutage aufgrund der komplexen Erscheinungsform von MB lediglich zur Einschätzung der klinischen Schwere des Krankheitsbilds und dessen Prognoseabschätzung hinzugezogen.



**Abbildung 1:** MRI eines Kindes mit zerebellärem Medulloblastom  
(A) Sagittalschnitt in T2-Wichtung mit Tumor (Kreis) und hyperintens zystischem Anteil (Pfeil).  
(B) und (C) Koronar- und Transversalschnitt mit Tumor (Kreis) in T1-Wichtung nach KM-Gabe [Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Jena, Patient P8].

**Tabelle 1:** Chang-Stadien für Medulloblastome

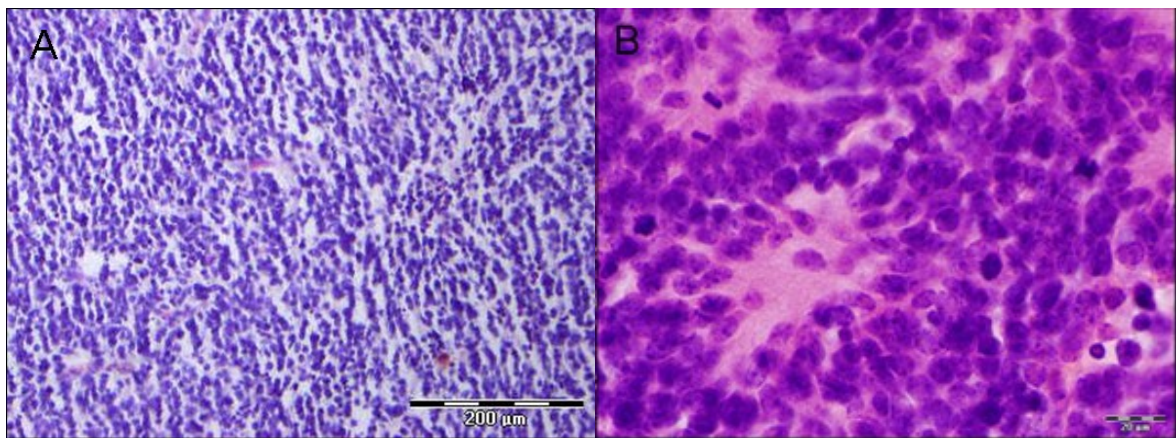
| Stadium           | Definition  |
|-------------------|---|
| <b>Tumoren</b>    |   |
| <b>T 1</b>        | Tumordurchmesser < 3 cm; Begrenzung auf Wurm, Ventrikeldach oder seltener Hemisphäre  |
| <b>T 2</b>        | Tumordurchmesser > 3 cm; Invasion einer benachbarten Strukturen oder der Rautengrube  |
| <b>T 3 a</b>      | Tumor mit Invasion in zwei Nachbarstrukturen oder kompletter Ausfüllung des 4. Ventrikels mit Ausdehnung in den Aquädukt oder in die For. Magendii/Luschkae; interner Hydrozephalus |
| <b>T 3 b</b>      | Tumor vom Ventrikelboden oder Hirnstamm ausgehend und die Rautengrube ausfüllend  |
| <b>T 4</b>        | Tumor durch Aquädukt in 3. Ventrikel bis Mittelhirn invadierend oder Halsmark eindringend   |
| <b>Metastasen</b> |   |
| <b>M 0</b>        | kein Nachweis subarachnoidaler oder hämatogener Metastasen  |
| <b>M 1</b>        | Tumorzellnachweis im Liquor   |
| <b>M 2</b>        | Tumorabsiedlung im zerebellären oder zerebralen SAR bzw. im inneren Liquorraum  |
| <b>M 3</b>        | Tumorabsiedlung im spinalen Subarachnoidalraum (SAR)  |
| <b>M 4</b>        | extraneurale Metastasen   |

[modifiziert nach Chang *et al.* 1969]

Medulloblastome werden entsprechend der WHO-Klassifikation in fünf histologische Gruppen gegliedert. Das klassische MB besteht aus dicht gepackten, kleinen und rundlichen Zellen, die sich durch eine Hyperchromasie auszeichnen (siehe Abb. 2A). Die Tumorzellen weisen einen großen Nucleus auf, der von wenig Zytoplasma umgeben ist. Ein typisches mikroskopisches Kriterium stellen neuroblastische Rosetten (Horner-Wright-Rosetten) dar (siehe Abb. 2B) [Giangaspero *et al.* 2007, Gulino *et al.* 2008]. Sie bestehen aus Tumorzellkernen, die zirkulär um Zytoplasmastränge angeordnet sind. Die Rosetten sind gekennzeichnet durch Kernpolymorphismen und zeugen von mitotischer Aktivität.

Auch Apoptosen und Nekroseareale können innerhalb des Tumors detektiert werden. Eine vaskuläre Hyperproliferation ist für MB untypisch [Collins 2004, Giangaspero *et al.* 2007]. Desmoplastisch-noduläre Medulloblastome treten in höherem Alter auf, haben eine weibliche Dominanz und zeichnen sich durch eine deutlich bessere Prognose aus [Gulino *et al.* 2008]. Diese Tumorform ist häufiger in den Kleinhirnhemisphären lokalisiert und zeigt meist keine leptomeningeale Beteiligung [Fruehwald-Pallamar *et al.* 2011]. MB mit extremer Nodularität imponieren durch ihre ausgedehnte, lobuläre Architektur. Die histologische Gruppe der anaplastischen Medulloblastome zeigt atypische Zellformen und eine hohe Mitoseaktivität. Großzellige Varianten machen etwa 2-4% des Embryonaltumors aus und werden durch große, blasige Zellkerne charakterisiert. Gemeinsam mit anaplastischen Formen haben sie die schlechteste Prognose [Gulino *et al.* 2008].

Trotz guter Klassifizierung der Heterogenität von Medulloblastomen fällt die histologische Differenzierung in der Praxis häufig schwer und ist von der Subjektivität des Untersuchers abhängig [Pomeroy *and* Cho 2011].



**Abbildung 2:** Mikroskopische Aspekte eines Medulloblastoms

(A) Schnittpräparat Medulloblastom P4 bei 100facher Vergrößerung in HE-Färbung. (B) Schnittbild Medulloblastom P8 bei 630facher Vergrößerung in HE-Färbung mit Darstellung von Homer-Wright-Rosetten [Institut für Pathologie Universitätsklinikum Jena, Patient P4 & P8].

Immunhistochemische Untersuchungen an Medulloblastomen konnten die Expression neuronaler Antigene wie Nestin oder Synaptophysin, die für die Neurogenese und -transmission essentiell sind, aufzeigen. Auch NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*), NSE (*neuron specific enolase*) sowie GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) konnten nachgewiesen werden [Son *et al.* 2003, Collins 2004, Giangaspero *et al.* 2007]. NCAM ist das am stärksten exprimierte Antigen in MB und wird unabhängig von der

histologischen Subgruppe ausgebildet [Son *et al.* 2003]. GFAP-positive Tumorzellen sind meist undifferenziert und gehören zur Gruppe der klassischen Medulloblastome [Giangaspero *et al.* 2007]. Anaplastische Subtypen zeigen wiederum keinen GFAP-Nachweis [Son *et al.* 2003]. Auch Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder FGF (*fibroblast growth factor*), die der Regulation der Angiogenese dienen, konnten immunzytochemisch in mikrovaskulären Kompartimenten von Medulloblastomen nachgewiesen werden. Ihr Einfluss auf die Neovaskularisierung kann das Wachstum von Medulloblastomen begünstigen [Huber *et al.* 2001].

### 1.1.2 Therapieprinzipien & Prognose

Die Behandlung von Medulloblastomen bedarf eines multimodalen, der Risikostratifizierung entsprechenden, Therapiekonzepts [Khatua *et al.* 2012].

Eine chirurgische Totalresektion wird angestrebt, ist jedoch aufgrund einer Hirnstammbeteiligung häufig nicht realisierbar. Da Medulloblastome hoch strahlen- und moderat chemotherapiesensible Neoplasien darstellen, werden therapeutische Maßnahmen entsprechend komplettiert. Die postoperative, fraktionierte Radiotherapie beinhaltet eine Einbeziehung der kraniospinalen Achse (mit 35 - 40 Gy) sowie die Aufsättigung der Bestrahlung der Tumorregion in der hinteren Schädelgrube (bis ca. 55 Gy). Chemotherapeutische Maßnahmen sind aufgrund der diffusen Dissemination des Tumors initiiert. Es besteht die Möglichkeit einer kombinierten, neoadjuvanten oder adjuvanten Zytostatikatherapie [Rieken *et al.* 2011]. Als Chemotherapeutika kommen Vincristin, Lomustin, Cisplatin und Cyclophosphamid zum Einsatz [Packer *et al.* 1991, Khatua *et al.* 2012]. Der Einsatz adjuvanter Therapiemaßnahmen hat die Langzeitprognose des Tumorleidens deutlich verbessert, sodass die 5-Jahres-Überlebensrate bei 60-80% liegt. Vor allem Patienten mit fortgeschrittener Tumorausdehnung profitieren von chemotherapeutischen Maßnahmen [Packer *et al.* 1991]. Trotz effektiven Therapieverfahren bleiben jedoch ein Drittel aller Patienten unheilbar und Rezidive häufig [Gilbertson 2004]. Zudem zeigen die Behandlungsmaßnahmen ein hohes neurotoxisches Potential. Vor allem die Tumorbestrahlung ist mit intellektuellen, endokrinologischen und physischen Schädigungen der jungen Patienten verbunden [Gilbertson 2004, Northcott *et al.* 2010].

Die Variabilität der Tumorausprägung und der damit verbundenen Krankheitsprognose bedarf, auch in Anbetracht möglicher Nebenwirkungen, eines individuellen Therapieschemas [Rieken *et al.* 2011, Khatua *et al.* 2012].

Das Tumorprofil von MB erlaubt eine Einteilung in Standard- und Hochrisikopatienten. Als relevante Einflussfaktoren gelten das Patientenalter bei Diagnosestellung, das Geschlecht, die histologische Differenzierung und zunehmend auch der molekulargenetische Status (siehe Kapitel 1.2 und 5.7) [Gilbertson 2004]. Zudem gelten das Ausmaß der chirurgischen Resektion, der Metastasierungsstatus und der Beginn postoperativer Maßnahmen als prognostisch wichtige Variablen [Rieken *et al.* 2011]. Die Gruppe der Standardpatienten weist ein Patientenalter von über 3 Jahren bei Erstdiagnose auf, zeigte keine Metastasierungen und profitiert von einer nahezu vollständigen Tumoresektion [Gilbertson 2004]. Als prognostisch günstig gelten weiterhin das weiblichen Geschlecht, desmoplastische Medulloblastome und die zeitnahe Initiation adjuvanter Therapieverfahren [Rieken *et al.* 2011].

### *1.2 Molekulargenetische Eigenschaften von Medulloblastomen*

Medulloblastome zeigen äußerst heterogene molekulargenetische Eigenschaften. Dabei tragen sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen zur Tumorentstehung und -progression bei. Medulloblastomzellen zeigen häufig Mutationen von Genen, die an der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems beteiligt sind und als Entwicklungs-Kontroll-Gene bezeichnet werden [Höhlriegel 2003]. Im Folgenden werden die bedeutsamsten und für die vorliegende Arbeit relevanten, genetischen Veränderungen beschrieben.

MB lassen sich in vier molekulargenetische Subgruppen gliedern, welche spezifische Genmutationen und unterschiedliche demographische sowie klinische Merkmale besitzen. Die WNT-Gruppe ist nach der Signalkaskade benannt, die darin involvierte Gene regulieren. Diese kann in 10-15% aller an MB erkrankten Patienten nachgewiesen werden [Northcott *et al.* 2010]. Die Subgruppe besteht meist aus klassischen, selten anaplastischen Medulloblastomen, die vorwiegend im Erwachsenenalter auftreten. Es zeigen sich charakteristische Mutationen des Onkogens CTNNB1 sowie des Tumorsuppressorgens APC, die Bestandteile des Wnt-Signalwegs sind und unter anderem Zelladhäsionsprozesse vermitteln. Zudem können Monosomien des 6. Chromosoms auftreten [Clifford *et al.* 2006, Gulino *et al.* 2008, Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Diese Formation hat im Vergleich zu den anderen Subgruppen eine sehr gute Langzeitprognose [Clifford *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2012]. Die SHH-Gruppe, ebenfalls nach dem zugehörigen Signalweg (*Sonic hedgehog*) bezeichnet, beinhaltet überwiegend desmoplastische Tumorformen im Kleinkind- und Erwachsenenalter und repräsentiert

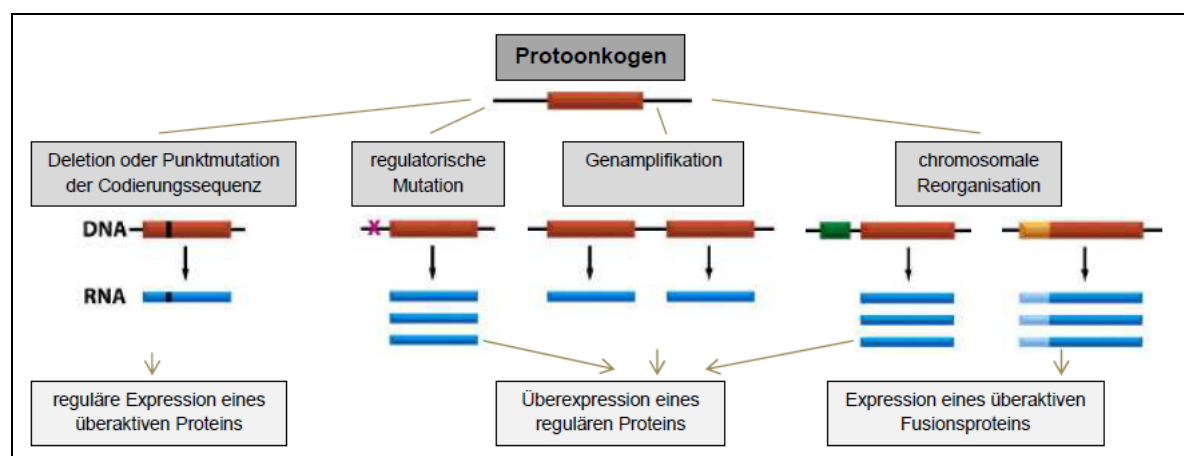
25 bis 30% aller MB [Northcott *et al.* 2010, Pomeroy and Cho 2011]. Typische Mutationen betreffen die Gene PTCH, SMO und SUFU [Rudin *et al.* 2009, Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Das Tumorsuppressorgen PTCH codiert ein zellmembranständiges Rezeptorprotein, dessen Inaktivierung zu einer gestörten Zellteilung führt und für die Wirkung genotoxischer Einflussfaktoren prädisponiert, was die Tumorentwicklung begünstigt [Lee *et al.* 2003, Sherr 2004]. Auch Amplifikationen der Onkogene GLI1 und GLI2, die Effektorproteine der SHH-Signalkaskade codieren, gelten als bekannt. Die Subgruppe 3 beinhaltet klassische, zumeist großzellige MB, die überwiegend im Kleinkinderalter auftreten. Chromosomale Aberrationen betreffen gehäuft die Chromosomen 1, 5 sowie 10, wobei die auftretenden Mutationen verschiedenartig sein können [Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Prognostisch bedeutsam sind Amplifikationen von Protoonkogenen der Myc-Familie, welche Zellwachstum vermitteln. Diese gehen mit einer verstärkten Metastasierung und einer schlechten Prognose einher [Northcott *et al.* 2009, Northcott *et al.* 2011, Pomeroy and Cho 2011, Taylor *et al.* 2012]. So konnten beispielsweise c-MYC-Amplifikation mit ausgedehnten Rückenmarks- und Hirnmetastasen in kindlichen Medulloblastomen assoziiert werden [Höhlriegel 2003]. Amplifikationen des Onkogens OTX2, das zur neuronalen Entwicklung beiträgt, und des erst kürzlich hinzugekommenen Reparaturgens EZH2 sind in Subgruppe 3 und 4 zu finden [Northcott *et al.* 2011, Robinson *et al.* 2012, Taylor *et al.* 2012]. Letztere macht etwa 30% aller Medulloblastome aus. In den überwiegenden Fällen sind Erwachsene betroffen, wobei eine Tendenz zum männlichen Geschlecht erkennbar ist [Taylor *et al.* 2012]. Diese Gruppe zeigt die häufigste strukturelle Aberration von Medulloblastomen, die das Chromosom 17 betrifft und in 50% der Fälle zu finden ist [Bayani *et al.* 2000, Clifford *et al.* 2006, Northcott *et al.* 2011]. Ein Isochromosom 17q ist gehäuft zu ermitteln, aber auch andere Deletionen, wie der isolierte Verlust von 17p, sowie Amplifikationen, beispielsweise 17q betreffend, sind möglich und von prognostischer Bedeutung [Gulino *et al.* 2008, McCabe *et al.* 2011, Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Das X-Chromosom kann ebenfalls strukturellen Aberrationen unterliegen [Gulino *et al.* 2008, Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Eine Überexpression der Onkogene CDK6 und PPM1D (siehe auch Kapitel 1.3.2.3), welche im Zusammenhang mit einer gehemmten Aktivität der TSGs TP53 und RB1 stehen, kann ebenfalls beobachtet werden. Die CDK6-Amplifikation ist ein ungünstiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben [Mendrzyk *et al.* 2005]. Neben den molekulargenetischen Gruppierungen gibt es eine Vielzahl zusätzlicher Chromosomenmutationen, die Kopienzahlveränderungen und Hypermethylierungen der

Promotorregion beinhalten. So imponieren metastasierende MB mit einer PDGFR-Überexpression, die Zellwachstum und -migration vermittelt [Northcott *et al.* 2010]. Die Aberration des Protoonkogens ERBB2 kann mit einer schlechteren klinischen Prognose in Verbindung gebracht werden [Gilbertson 2004]. Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53, das eine entscheidende Rolle für die Zellprogression und Apoptosevermittlung trägt, wurden schon frühzeitig mit der Entstehung von MB assoziiert [Lee *et al.* 2003]. Promotorhypermethylierungen der TSGs CASP8 (siehe Kapitel 1.4.2.2), HIC1 sowie RASSF1A (siehe Kapitel 1.4.2.6) gelten als tumorspezifisch [Lindsey *et al.* 2004]. Auch die epigenetische Ausschaltung des Tumorsuppressorgens EHMT1 (*euchromatic histone methyltransferase 1*), das eine Methyltransferase codiert, konnte neuerlich in MB nachgewiesen werden [Northcott *et al.* 2009, Northcott *et al.* 2010].

### 1.3 Onkogene

#### 1.3.1 Zelluläre Funktion und Bedeutung von Onkogenen

Onkogene können durch Mutations- bzw. Dysregulationsprozesse von Protoonkogenen entstehen [Alitalo 1984, Sherr 2004]. Diese tragen Schlüsselrollen in der Regulation von Genexpression, Zellreifung und -differenzierung sowie der zytoplasmatischen Signaltransduktion [Luczak and Jagodzinski 2006]. Durch chromosomale Translokation, Kopienzahlveränderungen oder Hypomethylierung regulatorischer DNA-Sequenzen kann es zur malignen Transformation von Protoonkogenen kommen (siehe Abb. 3) [Alitalo 1984, Knudson 2002, Luczak and Jagodzinski 2006].



**Abbildung 3:** Mechanismen der Onkogen-Aktivierung

Darstellung möglicher Mutationsprozesse von Protoonkogenen mit den zugehörigen genetischen und transkriptorischen Veränderungen [modifiziert nach Molecular Biology of the Cell. Chapter 24: The Molecular Genetics of Cancer Fig. 24-27. Garland Science 3<sup>rd</sup> Edition, 1994].

Die Überexpression autosomal-dominanter Onkogene ist mit einer Transkriptionsaktivierung vergesellschaftet [Brison 1993, Payne *and* Kemp 2005]. Die entstehenden Produkte zeigen eine, für die maligne Zelltransformation typische, gesteigerte Aktivität [Luczak *and* Jagodzinski 2006]. Die Überexpression von Onkogenen spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression maligner Tumore [Brison 1993, Schwab 1999, Quon *and* Berns 2001]. Onkogenamplifikationen, welche die genomische Instabilität von Krebszellen demonstrieren, können mit aggressiven Tumorformen assoziiert sein [Savelyeva *und* Schwab 2001, Lo *et al.* 2002]. Der Kopienzahlstatus einiger Onkogene gilt als Prognoseprädiktor für bestimmte Tumore, wie beispielsweise das Onkogen MYCN für Neuroblastome [Savelyeva *und* Schwab 2001, Schwab 1999, Combaret *et al.* 2012].

### 1.3.2 Ausgewählte Onkogene

Im Folgenden werden bedeutsame und in der vorliegenden Arbeit häufig involvierte Onkogene hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung beschrieben sowie Einblicke zum aktuellen Forschungsstand gewährt.

#### 1.3.2.1 FGF4

Das *fibroblast growth factor 4* (FGF4)-Gen, auf dem Genlocus 11q13 zu finden, vermittelt intrazelluläre Proliferations- und Migrationsprozesse und besitzt angiogenetische Potenz [Yoshida *et al.* 1994, Ornitz *et al.* 2001]. Tierexperimentelle Untersuchungen konnten eine Expression des Gens in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns nachweisen [Yamamoto *et al.* 2000]. Einer Familie von Wachstumsfaktoren zugehörig, reguliert FGF4 vorwiegend die Differenzierung neuronaler Zellen während der Embryonalentwicklung [Yamamoto *et al.* 2000, Ornitz *et al.* 2001, Duplan *et al.* 2002, Lieu *et al.* 2011]. In der postnatalen Phase fördert es die Reifung und Vernetzung von Neuronen [Yamamoto *et al.* 2000]. In adulten Zellen sind nur geringe Konzentrationen an FGF4 zu finden [Lieu *et al.* 2011].

Die Überführung in einen malignen Genotyp kann mit einer unkontrollierten Gewebsproliferation, neoplastischen Transformation und Tumorprogression vergesellschaftet sein [Schouten *et al.* 2008]. Eine Amplifikation des FGF4-Onkogens konnte in verschiedenen humanen Tumoren, wie Brust- und Magenkrebs sowie Epithelzellkarzinomen der Kopf-Hals-Region, nachgewiesen werden [Savelyeva *und* Schwab 2001, Schouten *et al.* 2008, Lieu *et al.* 2011].



Medulloblastomzelllinien zeigen einen positiven Rezeptorbesatz für eine FGF4-Bindung, Aberrationen des Wachstumsgens wurden bislang nicht beschrieben [Duplan *et al.* 2002].

#### 1.3.2.2 IGFBP5

Das *insulin-like growth factor binding protein 5* (IGFBP5) stellt ein Bindungs- und Regulationsprotein für *insulin-like growth factors* (IGFs) dar [Wang *et al.* 2006]. Das codierende Gen ist auf dem chromosomalen Abschnitt 2q35 lokalisiert. Insulinähnliche Wachstumsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle für die neuronale Entwicklung [de Bont *et al.* 2008].

Die Wirkung des IGFBP5-Systems auf Zellproliferation und Apoptoseinhibition begünstigt eine maligne Transformation [Zumkeller 2002, de Bont *et al.* 2008]. Das Bindungsprotein moduliert auto- und parakrine Mechanismen, welche ein lokales Wachstum diverser Hirntumore unterstützen können [de Bont *et al.* 2008]. Untersuchungen von Gliomen konnten einen IGFBP5-Anstieg bei zunehmender Malignisierung herausarbeiten [Wang *et al.* 2006]. Auch für Ependymome konnten erhöhte Werte des Regulationsproteins ermittelt werden [de Bont *et al.* 2008]. Eine Überexpression von IGFBP5 in Brusttumoren wurde mit einem erhöhten invasiven Tumorwachstum, einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegen IGF-Therapieansätze assoziiert [Becker *et al.* 2012]. IGFBPs stellen potentielle Tumormarker dar, deren Expression das Tumorstadium und Patientenüberleben beeinflusst [Zumkeller 2002].

In Medulloblastomen wurden signifikante IGFBP2- und IGFBP3-Anstiege erhoben [de Bont *et al.* 2008]. Für IGFBP5 konnten bislang keine hinreichenden Aussagen zu Mutation- oder Expressionsverhalten sowie klinischer Relevanz getroffen werden.

#### 1.3.2.3 PPM1D

Das *protein phosphatase magnesium-dependent 1δ* (PPM1D)-Gen, auf der Chromosomenregion 17q23.3 gelegen, codiert in humanen Zellen eine p53-induzierbare Phosphatase [Bulavin *et al.* 2002]. Das Onkogen wird durch zytotoxische Einflüsse verstärkt exprimiert [Castellino *et al.* 2008]. Das zugehörige Enzym stellt einen Negativregulator des Tumorsuppressorgens TP53 dar, sodass ein Feedbackmechanismus gewährleistet werden kann. Durch die Regulation der MAPK-Aktivität über PPM1D wird eine Phosphorylierung von p53 verhindert, wodurch die Vermittlung von Zellzyklusarrest und Apoptosevorgängen gehemmt wird [Bulavin *et al.* 2002, Castellino *et al.* 2008].

Eine PPM1D-Überexpression und die daraus resultierende, unterdrückte p53-Aktivität scheinen für die Tumorentstehung und -progression von Relevanz zu sein [Bulavin *et al.* 2002, Lambros *et al.* 2010]. Auch eine Resistenz gegen genotoxische Therapiemaßnahmen wäre dadurch bedingt [Bulavin *et al.* 2002, Castellino *et al.* 2008]. Eine Unterrepräsentation des Regulatorgens kann einer malignen Transformation entgegenwirken [Mendrzyk *et al.* 2005]. Genamplifikationen von PPM1D konnten in diversen Tumoren, beispielsweise Neuroblastomen und Brustkrebsformen, nachgewiesen werden [Bulavin *et al.* 2002, Lambros *et al.* 2010]. Kopienzahlerhöhungen des Onkogens konnten bei Patienten, die an Mammakarzinomen erkrankt waren, mit einem verminderten Rezidiv-freien Intervall assoziiert werden [Zhang *et al.* 2006]. Die Lebensfähigkeit humaner Tumorzellen, welche das Onkogen überexprimieren, kann durch einen selektiven PPM1D-Inhibitor reduziert werden [Rayter *et al.* 2008].

In Medulloblastomen wurden signifikante Aberrationen des Onkogens ermittelt [Mendrzyk *et al.* 2005, Castellino *et al.* 2008]. Eine Korrelation zum klinischen Erscheinungsbild bzw. Verlauf der kindlichen Hirntumore konnte bislang nicht festgestellt werden [Mendrzyk *et al.* 2005].

## 1.4 Tumorsuppressorgene

### 1.4.1 Zelluläre Funktion und Bedeutung von Tumorsuppressorgenen

Tumorsuppressorgene, auch als Anti-Onkogene bezeichnet, beeinflussen zelluläre Prozesse in vielseitiger Weise [Knudson 1989, Payne *and* Kemp 2005]. Sie inhibieren eine willkürliche Zellteilung und besitzen damit eine Krebs-protektive Eigenschaft. Tumorsuppressorgene modulieren die Proteinbiosynthese auf Transkriptionsebene und regulieren dadurch Prozesse des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und -migration sowie Mechanismen der DNA-Reparatur und Angiogenese [Knudson 2002, Sherr 2004].

Aufgrund verschiedenster Genommutationen, beispielsweise Deletionen oder Hypermethylierungen der Promotorregion, sowie mangelhafter Reparaturmechanismen kann es zur Transkriptionshemmung kommen [Jones *and* Baylin 2002, Stone *et al.* 2004, Zheng *et al.* 2005, Luczak *and* Jagodzinski 2006]. Der daraus resultierende Funktionsverlust des TSGs ist mit einer unkontrollierten Zellteilung verbunden, was die Entwicklung maligner Neoplasien begünstigt [Sherr 2004]. Neben ihrer Bedeutung in der Tumorgenese spielen Tumorsuppressorgene auch eine entscheidende Rolle für die maligne Progression [Baylin 2005, Zheng *et al.* 2005].

Im Vergleich zu Onkogenen treten Tumorsuppressorgene im Allgemeinen rezessiv in Erscheinung [Knudson 1971, Sherr 2004]. Nach der „*two-hit*“-Hypothese verursacht die Methylierung eines Allels zusammen mit der Mutation des zweiten Allels eine vollständige, homozygote Inaktivierung des Tumorsuppressorgens [Knudson 1971, Knudson 1989]. Aber auch ein heterozygoter Verlust eines TSGs kann die Karzinogenese fördern [Payne *and* Kemp 2005]. Dieser Aberrationsprozess wird mit dem Begriff der Haploinsuffizienz („*one-hit*“-Inaktivierung) beschrieben [Cook *and* McCaw 2000, Quon *and* Berms 2001, Sherr 2004, Payne *and* Kemp 2005]. So zeigt beispielsweise das PTCH-Gen, welches in die Signaltransduktion eingreift, einen haploinsuffizienten Phänotyp in Medulloblastomzellen des Mausmodells [Payne *and* Kemp 2005]. Mutationen von Tumorsuppressorgenen sollten daher als multifaktorielle und komplexe Mechanismen verstanden werden [Cook *and* McCaw 2000, Quon *and* Berms 2001, Payne *and* Kemp 2005].

#### 1.4.2 Ausgewählte Tumorsuppressorgene

Im Folgenden werden bedeutsame und in der vorliegenden Arbeit häufig involvierte Tumorsuppressorgene hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung beschrieben sowie Einblicke zum aktuellen Forschungsstand gewährt.

##### 1.4.2.1 ASC

Das Tumorsuppressorgen ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), das auch als TMS1 (*target of methylation-induced silencing 1*) bezeichnet wird, ist auf der Chromosomenregion 16p12 lokalisiert [Masumoto *et al.* 1999]. Es codiert ein intrazelluläres Signalprotein, das eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Caspasen zur Vermittlung von Apoptose- und Inflamationsprozessen trägt. Die ASC-Expression wird durch proinflammatorische Stimuli, wie eine TNF $\alpha$ -Wirkung, reguliert und geht mit einer Initiation des programmierten Zelltods einher. Eine hohe Expression ist physiologischerweise in Immunzellen, Neutrophilen sowie Monozyten zu finden [Parson *and* Vertino 2006].

Die epigenetische Ausschaltung des ASC-Gens durch aberrante DNA-Methylierung verhindert die Apoptose entarteter Zellen und begünstigt eine Tumorentstehung [Conway *et al.* 2000, Parson *and* Vertino 2006, Riojas *et al.* 2007]. Dies konnte für diverse Krebsformen, beispielsweise Glioblastome, gynäkologische Karzinome sowie kolorektale Tumore, gezeigt werden [Conway *et al.* 2000, Stone *et al.* 2004, Riojas *et al.* 2007,

Tamandani *et al.* 2009, Hong *et al.* 2013]. Für Letztere ergab sich ein statistisch relevanter Zusammenhang zur Aberrationshäufung und einem fortgeschrittenen Tumorstadium [Riojas *et al.* 2007]. Die klinische Korrelation von Glioblastomen konnte ein verlängertes Gesamtüberleben bei negativem Methylierungsstatus des Tumorsuppressorgens verzeichnen [Stone *et al.* 2004]. Untersuchungen an Zellkulturlinien verschiedener Tumore ergaben, dass bei reduzierter ASC-Expression die Apoptosewirkung von Chemotherapeutika abnimmt, woraus sich ein Überlebensvorteil für Tumorzellen ableiten lässt [Masumoto *et al.* 1999, Hong *et al.* 2013]. Eine Überexpression des Gens in Brusttumoren unterstützt den Untergang neoplastischer Zellen und inhibiert das Tumorwachstum [Conway *et al.* 2000].

Der Genstatus von Medulloblastomzellen hinsichtlich möglicher ASC-Aberrationen und deren klinischer Relevanz wurde bisher in wissenschaftlichen Arbeiten vernachlässigt.

#### 1.4.2.2 CASP8

Der Begriff Caspase 8 bezeichnet eine Cysteinprotease (*cysteine-aspartic acid protease 8*), die sowohl als Vermittler als auch Effektor von Apoptosevorgängen fungiert. Das codierende Gen CASP8 ist auf der Chromosomenregion 2q33.2 zu finden [Tamandani *et al.* 2009].

Die epigenetische Aberration des proapoptotischen Gens führt zur Resistenz gegen Apoptoseprozesse und fördert Tumorentstehung und -progress [Lindsey *et al.* 2004, Pingoud-Meier *et al.* 2003]. Obwohl das CASP8-Gen keine typische CpG-Region aufweist, konnten Promotorhypermethylierungen bereits in Neuro- und Glioblastomen detektiert werden, wobei für letztere ein Zusammenhang zwischen Methylierungsrate und raschem Tumorprogress ermittelt wurde [Banelli *et al.* 2000, Martinez *et al.* 2007].

In Medulloblastomen wurden ebenfalls signifikant gesteigerte Promotormethylierungen des Apoptosegens nachgewiesen [Lindsey *et al.* 2004, Ebinger *et al.* 2006]. Diese wurden mit statistischer Relevanz überwiegend bei histopathologisch klassischen oder großzelligen Subtypen erhoben [Lindsey *et al.* 2004]. Eine verminderte CASP8-Expression führte zu einem kürzeren progressionsfreien Intervall und einer reduzierten Gesamtüberlebenszeit [Pingoud-Meier *et al.* 2003]. Unter Einfluss von Interferon- $\gamma$  sowie Decitabin, einem demethylierenden Zytostatikum, präsentierten die kindlichen Hirntumore eine Überproduktion von Caspase 8, was mit einer gesteigerten Empfindlichkeit für eine Chemo- und Radiotherapie in Verbindung gebracht werden kann [Pingoud-Meier *et al.* 2003, Lindsey *et al.* 2004, Meister *et al.* 2007].

#### 1.4.2.3 GATA5

Das GATA5 (*GATA-binding protein 5*) ist ein DNA-bindendes Zinkfingerprotein, welches der Regulation von Transkriptionsvorgängen dient. Das zugehörige Gen ist auf Chromosom 20q13.33 lokalisiert und wird vorwiegend in ento- und mesodermalem Gewebe exprimiert [Zheng *et al.* 2011]. GATA5 greift in Prozesse der Zellreifung, -proliferation und -differenzierung ein und ist für die embryonale und postnatale Entwicklung diverser Organsysteme, z.B. Herz und Lunge, unablässig [Morrisey *et al.* 1997, Zheng *et al.* 2011].

Eine gestörte Expression des Tumorsuppressorgens kann zu einer malignen Transformation führen, da betroffene Zellen den regulären Zellzyklus verlassen und unkontrolliert proliferieren können [Zheng *et al.* 2011]. Die epigenetische Genausschaltung durch Promotormethylierung konnte in gastrointestinalen Tumoren, Nierenzell- sowie Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden [Guo *et al.* 2004, Zheng *et al.* 2011, Peters *et al.* 2012]. Für Lungentumore korrelierte eine gesteigerte Methylierungsrate mit einem höheren Patientenalter bei Tumormanifestation [Guo *et al.* 2004]. Untersuchungen von Nierenzellkarzinomen zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer GATA5-Hypermethylierung und einer gesteigerten Metastasierung sowie einem verkürzten progressionsfreien Intervall [Peters *et al.* 2012]. Die Behandlung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (Decitabin) kann eine Reaktivierung des Bindungsproteins initiieren [Guo *et al.* 2004, Zheng *et al.* 2011].

Für Medulloblastome wurde bislang kein Aberrationsstatus des Gens erhoben.

#### 1.4.2.4 MGMT

Das Reparaturgen MGMT (*O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase*) findet sich auf dem Genlocus 10q26 und wird unter Einfluss von Glukokortikoiden, ionisierender Strahlung und genotoxischen Substanzen exprimiert [Grombacher *et al.* 1996, Hegi *et al.* 2005]. Das zugehörige Protein entfernt Alkyladdukte, die sich fälschlicherweise der DNA anlagern und mutagene Wirkung besitzen. Damit vermittelt MGMT eine physiologische Resistenz gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika, zu denen Nitroseharbstoffe (wie Lomustin oder Carmustin) und Temozolomid zählen [Esteller and Herman 2004, Bobola *et al.* 2005]. Eine verminderte Genexpression führt zur Akkumulation von Mutationen und chromosomaler Instabilität, was die Entstehung maligner Neoplasien begünstigt [Jeuken *et al.* 2007]. Promotorhypermethylierungen des MGMT-Gens wirken fördernd

auf die Tumorentstehung und konnten bereits in Lungen- und Darmtumoren, Lymphomen sowie Gliomen detektiert werden [Jones *and* Baylin 2002, Esteller *and* Herman 2004, Hesson *et al.* 2004, Hegi *et al.* 2005, Jeuken *et al.* 2007]. Sie stellen ein Frühereignis der Karzinogenese dar und gelten ohne Therapie als ungünstiger Prognosefaktor [Esteller *and* Herman 2004, Jeuken *et al.* 2007]. Die epigenetische Genaussschaltung und inhibierte Proteinexpression ist mit einer verminderten Reparaturkapazität von Tumorzellen und einer Chemosensitivität gegenüber Alkylanzien assoziiert [Esteller *and* Herman 2004, Rood *et al.* 2004, Hegi *et al.* 2005, Jeuken *et al.* 2007].

Forschungsarbeiten bezüglich des MGMT-Status von Medulloblastomzellen ergaben unterschiedliche Resultate, die eine Variabilität der Genausprägung vermuten lassen. Einerseits konnten Aktivitätslevel in den Tumoren nachgewiesen werden [Bobola *et al.* 2005]. Andererseits wurden Hypermethylierungen des Reparaturgens detektiert, welche jedoch keinen Bezug zur Expression des zugehörigen Proteins zeigten [Rood *et al.* 2004]. Ebinger *et al.* konnten wiederum keinen Methylierungsnachweis des TSGs erbringen [Ebinger *et al.* 2006]. Eine andere Arbeit ermittelte zwar einen inversen Zusammenhang zwischen Genmethylierung und Proteinexpression, eine Korrelation zur Überlebenszeit konnte jedoch nicht festgestellt werden [Faoro *et al.* 2011].

#### 1.4.2.5 MSH6

Das Gen MSH6 (*MutS homolog 6*) bindet fehlgepaarte Nukleotide und initiiert DNA-Reparaturmechanismen. Das auf dem chromosomalen Abschnitt 2p16 lokalisierte Tumorsuppressorgen ist damit Bestandteil des Mismatch-Reparatur (MMR)-Systems.

Eine heterozygote Inaktivierung von MSH6 ist mit der Entstehung des Lynch-Syndroms bzw. des hereditären, nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC) vergesellschaftet. Homozygote Genmutationen stellen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung bösartiger Krebsformen im Kindesalter dar [Poley *et al.* 2007, Scott *et al.* 2007, Ilencikova *et al.* 2011]. Dabei treten überwiegend Hirntumore, beispielsweise Glioblastome, und hämatologische Neoplasien, wie Lymphomerkrankungen, auf [Scott *et al.* 2007, Ilencikova *et al.* 2011]. Ein fehlerhaftes MMR-System, beispielsweise durch MSH6-Aberrationen hervorgerufen, kann eine Resistenzentwicklung gegen bestimmte Chemotherapeutika, wie Temozolomid oder Cisplatin, fördern [Fedier *und* Fink 2004, Yip *et al.* 2009]. Der Einsatz entsprechender Zytostatika wäre damit nicht nur ineffektiv, er würde auch zu einer gesteigerten Mutation betroffener Zellen führen [Fedier *und* Fink 2004, Scott *et al.* 2007].

Eine biallelische Genausschaltung und verminderte Exprimierung können die Entstehung von Medulloblastomen begünstigen [Poley *et al.* 2007, Scott *et al.* 2007]. Auch Hypermethylierungen des Tumorsuppressorgens wurden bereits in den pädiatrischen Tumoren nachgewiesen [Viana-Pereira *et al.* 2009].

#### 1.4.2.6 RASSF1A

Das pleiotrope RASSF1A (*Ras association domain-containing protein 1A*)-Gen mit dem Locus 3p21.3 vermittelt eine Reihe zellulärer Regulationsmechanismen. Das transkribierte Protein tritt in Interaktion mit dem Protoonkogen RAS (*Rat sarcoma*) [Jones and Baylin 2002, Tomlinson *et al.* 2002, Hesson *et al.* 2004, Agathangelou *et al.* 2005]. Es reguliert den Zellzyklus, greift in die Apoptose ein und fördert die mikrotubuläre Stabilität des Zytoskeletts, was eine Zelladhäsion und -motilität fördert [Agathangelou *et al.* 2005, Levesley *et al.* 2011].

Eine RASSF1A-Expression in Tumorzellen geht mit einer geringeren Vitalität, einem gehemmten Wachstum und einer herabgesetzten Invasionsneigung einher [Hesson *et al.* 2004, Agathangelou *et al.* 2005]. Promotorhypermethylierungen des Tumorsuppressorgens konnten bereits in humanen Tumoren der Brust, Lunge, Prostata sowie des Magen-Darm-Trakts detektiert werden [Jones and Baylin 2002, Agathangelou *et al.* 2005]. Auch Primärtumore und Zelllinien von Gliomen zeigen epigenetische Veränderungen, welche tendenziell mit einem höheren Tumorgrad assoziiert sind [Hesson *et al.* 2004, Martinez *et al.* 2007].

Medulloblastome präsentieren eine tumorspezifische, extrem gesteigerte RASSF1A-Hypermethylierung [Lusher *et al.* 2002, Lindsey *et al.* 2004, Chang und Ng 2007]. Die daraus resultierende Genausschaltung kann in über 79% aller Primärtumoren nachgewiesen werden. Das TSG ist damit das wahrscheinlich wichtigste aberrierte Gen dieser Hirntumore. Promotorhypermethylierungen sind dabei unabhängig vom histopathologischen Subtyp, Geschlecht oder Alter der Patienten [Lusher *et al.* 2002]. Eine Reexpression von RASSF1A durch den Einsatz von Decitabin konnte in Gliomen, PNETs und Medulloblastomzelllinien den Tumorprogress herabsetzen [Lusher *et al.* 2002, Hesson *et al.* 2004, Lindsey *et al.* 2004, Chang und Ng 2007].

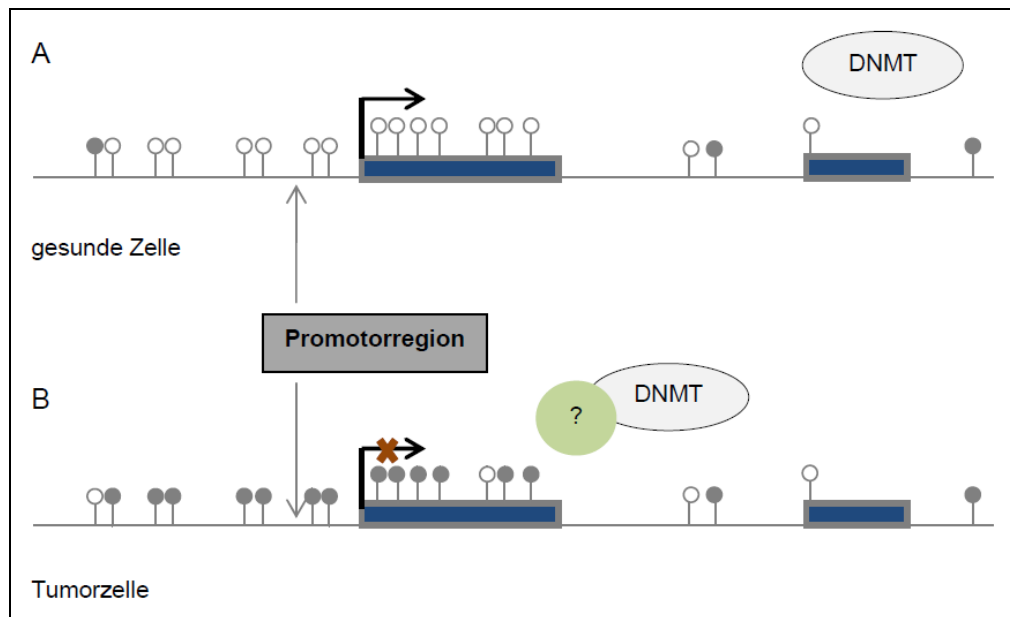
### 1.5 Ausgewählte Aberrationsmechanismen

Hinsichtlich ihrer Mechanismen und daraus resultierenden, genetischen Veränderungen werden verschiedene Aberrationsformen unterschieden. Im Folgenden werden die innerhalb dieser Arbeit untersuchten Mutationen näher erläutert.

Eine Möglichkeit der genetischen Aberration stellen Kopienzahlveränderungen dar, welche sich als Amplifikationen oder Deletionen präsentieren können. Als Amplifikation bezeichnet man die Kopienzahlerhöhung eines DNA-Abschnitts [Schwab 1999]. Der Begriff Deletion beschreibt den Verlust chromosomaler Fragmente. Mögliche Ursache von Kopienzahlveränderungen sind Doppelstrangbrüche der DNA aufgrund ionisierender Strahlung oder der Wirkung freier Radikale [Pastwa *and* Blasiak 2003, Iliakis *et al.* 2004]. Schäden des genetischen Materials sowie fehlerhafte Reparaturprozesse vermindern die genomische Stabilität und können Auslöser von Mutationen, Zellentartung oder –tod sein [Lo *et al.* 2002, Pastwa *and* Blasiak 2003, Iliakis *et al.* 2004]. Neben der Entstehung von bösartigen Tumoren ist auch deren maligne Progression durch eine Anhäufung genetischer Aberrationen gekennzeichnet [Payne *and* Kemp 2005, Zheng *et al.* 2005].

Auch Hypermethylierungen der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen stellen eine relevante Form der Genveränderung dar und können bei etwa 50% aller menschlichen Gene nachgewiesen werden [Schouten *et al.* 2002]. DNA-Methylierungen dienen innerhalb der Embryogenese der genomischen Prägung bzw. der Stilllegung von Genen [Agathangelou *et al.* 2005]. Ihre Aberration verändert die ursprüngliche DNA-Sequenz jedoch nicht, sodass Promotorhypermethylierungen als epigenetische Veränderungen bezeichnet werden [Jones *and* Baylin 2002, Baylin 2005]. Methylierungen finden sich häufig in der Nähe Transkription-induzierender Promotoren (siehe Abb. 4) [Herman *and* Baylin 2003, Northcott *et al.* 2010]. Dort binden sie an Cytosin-Guanin-Dinukleotiden, sogenannten CpG-Inseln. Diese Regionen ermöglichen nur in unmethylierter Form eine Genexpression. Durch die Hypermethylierung von Promotorregionen wird eine Transkription verhindert, woraus ein heterozygoter Funktionsverlust des betroffenen Gens resultiert (siehe auch Kapitel 1.4.1) [Jones *and* Baylin 2002, Herman *and* Baylin 2003]. Die Relevanz dieses Aberrationsmechanismus für die Entstehung und Progression maligner Neoplasien ist für eine Vielzahl von Tumorsuppressorgenen wahrscheinlich [Baylin 2005]. Dies wird durch die Überexpression von DNA-Methyltransferasen, welche Methylierungsprozesse katalysieren, in verschiedenen Malignomen bekräftigt [Luczak *and* Jagodzinski 2006].





**Abbildung 4:** Methylierungsstatus gesunder Zellen im Vergleich zu Tumorzellen

Darstellung der Exonregionen als blaue Box, die Verbindungslinie kennzeichnet die Introns. CpG-Dinukleotide sind als kleine Kreise markiert. Graue Kreise verdeutlichen Methylierungen, weiße Kreise entsprechen der unmethylierten Konfiguration. Regionen mit Reichtum an CpG-Dinukleotiden stellen CpG-Inseln dar. Diese sind vornehmlich in Promotorregionen zu finden. Kennzeichnung der Promotorregion sowie Darstellung der Transkriptionsinitiierung mittels schwarzen Pfeils. DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysieren Methylierungsprozesse.

A) In gesunden Zellen erscheinen CpG-Dinukleotide außerhalb von CpG-Inseln methyliert (graue Kreise), was ungewollte Transkriptionsvorgänge verhindert. Nahe der Promotorregion liegen die CpG-Inseln in unmethylierter Form vor (weiße Kreise). Dies ermöglicht eine gezielte Gentranskription. B) In Tumorzellen zeigt sich ein umgekehrtes Methylierungsverhalten. Periphere CpG-Dinukleotide, welche normalerweise methyliert erscheinen, stellen sich nun unmethyliert dar. Die abnormale Hypermethylierung der Promotorregion führt zum Abbruch der Gentranskription (gekennzeichnet durch ein rotes Kreuz). Zudem finden sich DNA-Methyltransferasen gehäuft in der Nähe von Promotorhypermethylierungen. Es konnte noch nicht hinreichend geklärt werden, warum DNMTs zu fehlerhaftem Katalysierungsverhalten neigen [modifiziert nach Herman *and* Baylin 2003].

## 1.6 Methoden zur Erfassung genetischer Aberrationen

### 1.6.1 Standardverfahren in der Übersicht

Die Untersuchung des genetischen Status rückte in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Fokus laborexperimenteller Arbeit und entwickelt sich stetig fort.

Die Karyotypisierung nach Giemsa-Färbung stellt das älteste Verfahren zur Untersuchung chromosomaler Abnormalitäten dar. Innerhalb der molekularen Zytogenetik ermöglicht die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durch spezifische Bandenfärbung eine genauere Analyse struktureller Aberrationen [Gray *and* Collins 2000, Teixeira 2002]. Auch die vergleichende genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridisation* = CGH), die ebenfalls auf Fluoreszenzmarkierung basiert, gehört heute zu

den Standardverfahren zur Detektion von Chromosomenanomalien [Weiss *et al.* 1999, Teixeira 2002]. Der Mikrosatelliten-basierte Nachweis von Heterozygositätsverlusten (*loss of heterozygosity* = LOH) bedient sich des individuellen Musters nicht-kodierender, hochrepetitiver DNA-Sequenzen [Hofmann 2008]. Mikroarray-Technologien, wie Array-CGH oder SNP-Array (*single nucleotide polymorphism* = SNP), ermöglichen die automatisierte Hybridisierung einer Vielzahl zunehmend kleiner werdender DNA-Sequenzen [Gray *and* Collins 2000]. Aber auch molekularbiologische PCR-Untersuchungen mit Multiplex-Ansatz gewinnen an Bedeutung. Unter ihrer Anwendung kann die Genomsequenz bis auf wenige Basenpaare analysiert werden [Northcott *et al.* 2010].

### 1.6.2 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

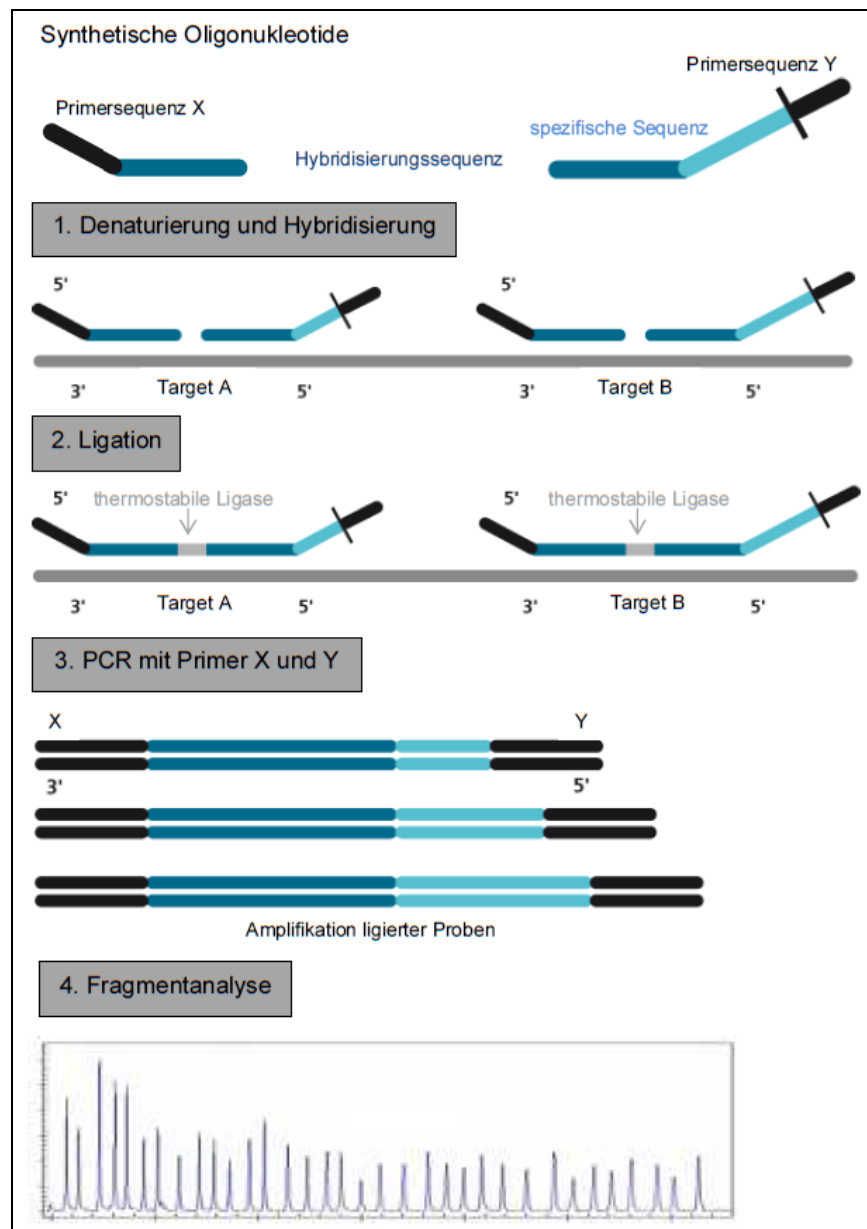
#### 1.6.2.1 Prinzip des MLPA-Verfahrens

Die *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) ist eine spezifizierte PCR-Methode, welche eine genetische Analyse von bis zu 45 verschiedenen DNA-Sequenzen anhand eines simultanen Arbeitsschritts ermöglicht [Schouten *et al.* 2008]. Für das von Schouten *et al.* 2002 etablierte Verfahren werden nur 20 ng der zu untersuchenden Proben-DNA benötigt [Schouten *et al.* 2002]. Die Methode dient der Detektion von Kopienzahländerungen im Sinne von Amplifikationen und Deletionen. Mit einer Modifikation der Methode lässt sich darüber hinaus auch der Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen ermitteln (siehe Kapitel 1.6.2.2).

Für das MLPA-Verfahren kommen spezielle Sonden zur Anwendung, welche in kommerziellen Probe-Mixes erhältlich sind. Diese beinhalten synthetisierte Oligonukleotide, die spezifisch an DNA-Sequenzen (*Targets*) binden und eine Amplifizierung des Zielgens in Abhängigkeit vom genetischen Status ermöglichen. Jede MLPA-Sonde besteht aus einem kurzen und einem langen Oligonukleotid, welches jeweils aus einer Primer- und einer Hybridisierungssequenz besteht [Schouten *et al.* 2002].

Das Prinzip der MLPA-Reaktion wird in Abbildung 5 veranschaulicht. Nach Denaturierung der zu untersuchenden DNA erfolgt die Zugabe der Sonden. Bei Vorhandensein der entsprechenden DNA-Sequenz kommt es zur Anlagerung der beiden Oligonukleotide. Das kurze Oligonukleotid trägt am 3'-Ende die Hybridisierungssequenz und am 5'-Ende eine universelle Sequenz zur späteren Probenamplifizierung (Primersequenz). Das lange Oligonukleotid trägt an seinem 5'-Ende eine

Hybridisierungssequenz, welche sich direkt neben der Bindungsstelle des kurzen Oligonukleotids der DNA anlagert und eine Hybridisierungsreaktion auslöst. Durch Ligation mittels thermostabiler Ligase werden beide Enden verbunden. Diese Reaktion verläuft in einem Multiplex-Ansatz für alle zu untersuchenden Gene gleichzeitig. Da alle ligierten Proben identische Endsequenzen tragen, ist anschließend eine simultane Amplifizierung durch ein einziges Primer-Paar möglich [Schouten *et al.* 2002].



**Abbildung 5:** Prinzip der MLPA-Reaktion

1. Denaturierung und anschließende Hybridisierung durch Bindung Sequenz-spezifischer Oligonukleotide (MLPA-Sonden) an Zielabschnitten der zu untersuchenden DNA. 2. Ligation durch eine thermostabile Ligase. 3. PCR-Reaktion mit Amplifizierung der Proben und anschließende Auftrennung entsprechend der Fragmentlänge. 4. Fragmentanalyse der PCR-Produkte [modifiziert nach Medizinisch Genetisches Zentrum München].

Eine spezifische Sequenz auf dem langen Oligonukleotidarm, die sogenannte *stuffer sequence*, ermöglicht eine gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte anhand der Länge und eine daraus resultierende Zielgenidentifikation (siehe Kapitel 4.3) [Schouten *et al.* 2002]. Die Fragmente besitzen eine Größe von 130 bis 472 Basenpaaren und eine jeweilige Längendifferenz von 6 bis 9 bp.

Die Menge des entstandenen Amplifizierungsprodukts lässt Rückschlüsse auf den Amplifikations- beziehungsweise Deletionsstatus des analysierten DNA-Abschnittes zu. Mittels densitometrischer Messung der Stärke einer Signalbande ist eine quantitative Beurteilung des Kopienzahlstatus möglich (vergleiche Kapitel 3.5).

#### 1.6.2.2 Prinzip des MS-MLPA-Verfahrens

Die *methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification* (MS-MLPA) stellt ein Verfahren dar, mit dem neben Kopienzahlveränderungen auch Promotormethylierungen von Tumorsuppressorgenen erfasst werden können. Dabei sind die angewandten Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte mit der MLPA identisch. Die verwendeten Oligonukleotide richten sich mit ihren Komplementärsequenzen gegen Promotorregionen zu untersuchender Zielgene. Im Anschluss an die Ligation wird eine Methylgruppen-sensitive Restriktionsendonuklease (*HhaI*-enzyme) hinzugefügt. Diese weist eine hohe Bindungsspezifität auf und benötigt innerhalb des Tumorsuppressorgens eine Erkennungssequenz, welche aus einer Cytosin-Guanin-Cytosin-Guanin-Basenpaarung besteht und als *HhaI-site* bezeichnet wird [Nygren *et al.* 2005]. Da nur Zielgene mit einer entsprechenden Bindungssequenz auf Methylierungen untersucht werden können, bleibt für einige auf Kopienzahlanomalien untersuchte Gene eine diesbezügliche Bewertung aus. Tumorsuppressorgene, die keine Promotormethylierung aufweisen, werden enzymatisch verdaut, können nicht amplifiziert werden und erzeugen kein Bandensignal [Schouten *et al.* 2002]. In nachfolgenden, gelelektrophoretischen Darstellungen bleibt ein Signalnachweis aus. Methylierte Gene werden nicht abgebaut und erzeugen ein Amplifizierungsprodukt. Die entstehenden PCR-Produkte besitzen eine Größe von 136 bis 481 Basenpaaren mit einer Längendifferenz von 6 bis 11 Basenpaaren. Die Methylierung des untersuchten DNA-Abschnitts wird in anschließender Gelelektrophorese durch ein zusätzliches Bandensignal sichtbar [Nygren *et al.* 2005, Schouten *et al.* 2008].

## 2 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit orientierte sich an folgenden Zielen:

- Detektion von Kopienzahlveränderungen sowie Erfassung potentieller Promotormethylierungen von Tumorsuppressorgenen bei Medulloblastomzellen mithilfe des (MS-)MLPA-Verfahrens.
- Analyse der Genaberrationen von Primärtumoren im Unterschied zu humanen Medulloblastomzelllinien sowie Aufzeigen gemeinsamer Mutationseigenschaften von Primärtumoren.
- Untersuchung von häufig involvierten Genen.
- Beleuchtung eines möglichen Zusammenhangs zwischen genetischem Status und klinischem Erscheinungsbild.
- Beurteilung der Validität der angewandten Untersuchungsmethode und Einordnung der erhobenen Daten in Bezug auf methodisch differente Studien zu Genmutationen von Medulloblastomen.
- Vergleich der unterschiedlichen Probenmaterialien und deren Konservierungsmethoden hinsichtlich ihrer Aussagekraft für genetische und epigenetische Untersuchungen.
- Einschätzung der klinischen Relevanz für zukünftige Diagnostik, prognostische Vorhersagen und mögliche Therapieansätze.

### 3 Material und Methoden

#### *3.1 Angaben zum Probenumfang*

Im vorliegenden Projekt sollten sowohl primäres Tumorgewebe als auch permanente humane Zellkulturlinien untersucht und miteinander verglichen werden. Die Tumorsammlung bestand aus 25 Proben, welche sich hinsichtlich ihres Ausgangsmaterials voneinander unterschieden. Zum einen wurden 8 Paraffin-gebettete Proben akquiriert (Institut für Pathologie Arbeitsbereich Neuropathologie des Universitätsklinikums Jena und Institut für Neuropathologie Universitätsmedizin Göttingen), zum anderen konnte auf 12 kryokonservierte Exemplare (Neurochirurgische Klinik des Universitätsklinikums Würzburg) zurückgegriffen werden. Für die nachstehenden Untersuchungen konnte weiterhin die DNA von 5 Medulloblastom-Zelllinien (AG Prof. Dr. med. T. Pietsch Institut für Neuropathologie Universitätsklinikum Bonn) verwendet werden.

Für die Aushändigung und Bearbeitung entsprechender Probendaten wurde das Votum der Ethikkommission eingeholt (siehe Anhang). Um die Personenschutzrechte der betroffenen Patienten zu wahren, fanden die nötigen Informationen, nach aktuell geltenden Regeln des Datenschutzes, in anonymisierter Form Verwendung.

Bei der statistischen Betrachtung des Durchschnittsalters aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ergab sich ein Mittelwert von 12,8 Jahren (Min=0,3 Jahre, Max=66 Jahre) sowie ein Median von 5 Jahren. Die Geschlechtsverteilung der Patienten wies ein Verhältnis von 40% weiblichen (8 von 20) zu 60% männlichen (12 von 20) Patienten auf (siehe Tab. 2).

Die zu untersuchenden Medulloblastom-Zellkulturlinien repräsentieren trotz unterschiedlichem Differenzierungsgrad und Genstatus spezifische Charakteristika primärer Medulloblastomzellen (siehe Tab. 3).

Die permanente, humane MB-Zelllinie DAOY, welche geringgradig neuronale, jedoch keine glialen Reifezeichen repräsentiert, wurde verwendet. Diese mäßig differenzierte Zelllinie zeichnet sich durch eine deutliche Zellproliferation, Überexpression des Tumorsuppressorgens p53 sowie das Vorhandensein von Oberflächenmarkern und Zelladhäsionsmolekülen aus [Jacobsen *et al.* 1985]. Zudem konnte laborexperimentell eine Expression von Wachstumsfaktoren (VEGF sowie FGF) nachgewiesen werden [Huber *et al.* 2001].

**Tabelle 2:** Statistische Angaben und Kodierung der Tumorproben

| Probenmaterial | Kodierung | Geschlecht | Alter in Jahren | Liquorbefund bei Diagnose | Rezidiv in 1 Jahr | Letalität (Stand 01/12) |
|----------------|-----------|------------|-----------------|---------------------------|-------------------|-------------------------|
| Paraffinblock  | P1        | weiblich   | 50              | positiv                   | nein              | nein                    |
| Paraffinblock  | P2        | männlich   | 6               | -                         | -                 | -                       |
| Paraffinblock  | P3        | weiblich   | 5               | positiv                   | ja                | ja                      |
| Paraffinblock  | P4        | männlich   | 29              | positiv                   | nein              | nein                    |
| Paraffinblock  | P5        | weiblich   | 39              | positiv                   | ja                | nein                    |
| Paraffinblock  | P6        | männlich   | 66              | negativ                   | ja                | nein                    |
| Paraffinblock  | P7        | männlich   | 3               | positiv                   | nein              | nein                    |
| Paraffinblock  | P8        | weiblich   | 5               | negativ                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T21       | weiblich   | 2               | negativ                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T22       | männlich   | 4               | -                         | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T23       | weiblich   | 5               | positiv                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T24       | männlich   | 2               | positiv                   | ja                | ja                      |
| Kryokonservat  | T25       | männlich   | 4               | positiv                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T26       | weiblich   | 0,8             | negativ                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T27       | männlich   | 10              | positiv                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T28       | männlich   | 14              | positiv                   | ja                | ja                      |
| Kryokonservat  | T29       | männlich   | 1               | negativ                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T30       | weiblich   | 6               | negativ                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T31       | männlich   | 0,3             | negativ                   | nein              | nein                    |
| Kryokonservat  | T32       | männlich   | 3               | positiv                   | nein              | nein                    |

Die permanente Zelllinie MHH-Med 4, hervorgegangen aus kontinuierlicher Kultivierung über 2 Jahre mit mehr als 50 Passagen, wurde mit dem Ziel etabliert, dem Verhalten primärer Tumore möglichst nahe zu kommen und dahingehend repräsentative Werte zu vermitteln. Sie besteht aus undifferenzierten Zellen, denen Marker für spätere neuronale oder gliale Reifung weitgehend fehlen. Hinsichtlich des Genstatus kann eine Trisomie 1q bei intaktem Chromosom 17 festgehalten werden [Pietsch *et al.* 1994].

Von dieser Zelllinie wurden weitere 2 Klone in den nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Diese, durch Transfektion veränderten Zellklone, grenzen sich durch unterschiedlich starken Rezeptorbesatz hinsichtlich TrkC von der Ursprungsform ab. Der TrkC-Rezeptor (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3*) vermittelt die Effekte des Wachstumsfaktors Neurotrophin-3, welcher eine wichtige Rolle für neuronale Zellproliferation, -differenzierung und -überleben spielt. Auch dessen Bedeutung für die Tumorgenese, speziell für die Entstehung von Medulloblastomen, gilt als bekannt. Eine

hohe Expression des TrkC-Rezeptors wird als positiver Prädiktor für ein längeres Überleben identifiziert [Gulino *et al.* 2008, Gruber-Olipitz *et al.* 2009]. Somit kann bei positivem Rezeptorstatus von einem weniger aggressiven Phänotyp ausgegangen werden [Gruber-Olipitz *et al.* 2009].

MEB-Med 8S, eine schnell wachsende, aggressive Medulloblastom-Zelllinie, ist von nahezu undifferenzierten Zellen geprägt. Laborexperimentell konnte kein TrkC-Rezeptorbesatz ermittelt werden [Höhlriegel 2003].

**Tabelle 3:** Übersicht zu verwendeten Medulloblastom-Zelllinien

| Zellkulturlinie  | Kodierung | Differenzierungsgrad |
|------------------|-----------|----------------------|
| DAOY             | Z1        | mäßig differenziert  |
| MHH-Med 4 TRKC 1 | Z2        | undifferenziert      |
| MHH-Med 4 TRKC 2 | Z3        | undifferenziert      |
| MHH-Med 4        | Z4        | undifferenziert      |
| MEB-Med 8S       | Z5        | undifferenziert      |

### 3.2 Erhebung klinischer Daten

Um für jede der untersuchten Tumorproben Angaben zum Geschlecht des Patienten und Alter bei Diagnosestellung sowie Klassifikation der Tumorentität (z.B. Einordnung als Primärtumor, Rezidiv oder Metastase) zu erhalten, wurden die jeweiligen Patientenakten gesichtet. Bezüglich diagnostischer Befunde wurden verschiedenste MRT-Parameter (z.B. Größe, Lokalisation, Homogenität, Kontrastmittelaufnahme, eventuell nachweisbare Zysten, kraniospinale Metastasierung), histologische Kriterien (beispielsweise Mitoseindex, Hyperchromasie, Verkalkungen, Nekrosen, Apoptosen), immunhistochemische Befunde (z.B. Immunfärbungen für GFAP oder NSE) und die Ergebnisse von Lumbalpunktionen (wie Zellenachweis und -zahl im Liquor) zusammengetragen. Des Weiteren wurden adjuvante Therapieverfahren und deren Erfolge sowie Rezidivrate (ausgehend von einem einheitlichen Beobachtungszeitraum von 1 Jahr) und Letalität, orientierend an aktuellen Befunden (Stand 01/2012), evaluiert (siehe ebenfalls Tab. 2).



### 3.3 *Aufbereitung der Tumorproben*

#### 3.3.1 Anfertigung histologischer Schnittpräparate

Zur Beurteilung der vorliegenden Paraffinblöcke hinsichtlich ihrer Qualität und zur Detektion eines für die weitere Aufarbeitung günstigen Tumorareals, wurden mittels Rotationsmikrotom (Rotatory 3003, pfm medical AG, Köln) histologische Dauerpräparate der Proben mit einer Schichtdicke von 5 µm angefertigt. Diese wurden orientierend am Protokoll nach Ehrlich mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (siehe Abb. 6). Nach anschließendem Eindecken mittels Schnelleindeckmittel (Microscopy Entellan, Merck Chemicals KGAA, Darmstadt) und Deckgläsern (Menzel-Gläser, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) standen die gefärbten Schnitte der histologischen Beurteilung zur Verfügung (siehe Kapitel 4.1).

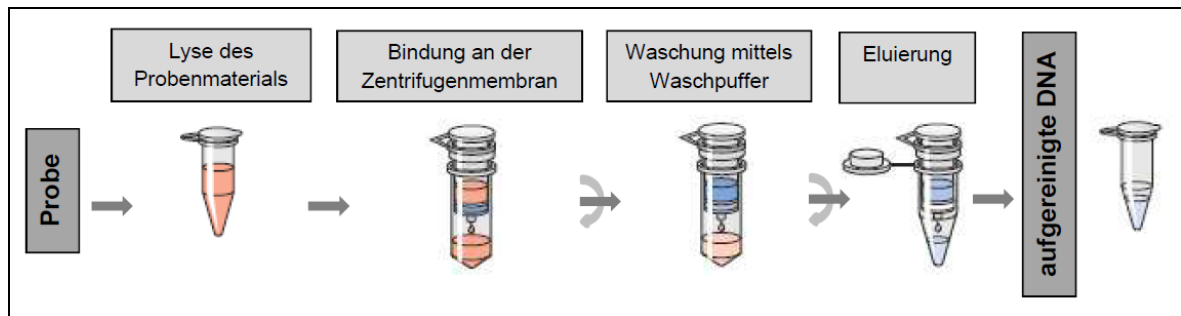
| <b>Schnellverfahren HE-Färbung</b> |   |            |
|------------------------------------|---|------------|
| 1.                                 | Entparaffinierung im Xylolbad                                 | (8 min)    |
| 2.                                 | Rehydrierung über Ethanolreihe in absteigender Konzentration  | (je 2 min) |
| 3.                                 | Spülen mit Wasser und Aquadest                                | (3 min)    |
| 4.                                 | Kernfärbung in saurer Hämalaunlösung nach Mayer               | (2 min)    |
| 5.                                 | „Bläuen“ durch Spülen mit Leitungswasser                      | (5 min)    |
| 6.                                 | Spülen mit Aquadest   |            |
| 7.                                 | Zytoplasmafärbung in 1% Eosinlösung                           | (2 min)    |
| 8.                                 | Spülen mit Aquadest   |            |
| 9.                                 | Dehydrierung über Ethanolreihe in aufsteigender Konzentration | (je 1 min) |
| 10.                                | Xylolbad zur vollständigen Alkoholextraktion                  | (1 min)    |

**Abbildung 6:** Protokoll nach Ehrlich zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung

#### 3.3.2 DNA-Isolierung des Probenmaterials

Nach histopathologischer Detektion einer für die DNA-Gewinnung geeigneten Tumorregion wurde das entsprechende Gebiet mit einem Skalpell disseziert. Die Probendissectate, divergierend in ihrem Ausgangsgewicht von 25-35 mg, wurden zerkleinert und mit Xylol und Ethanol entparaffiniert, um die Grundlage für die DNA-Isolierung zu schaffen. Diese konnte mithilfe des kommerziellen QIAamp DANN Mini Kit der Firma QIAGEN durchgeführt werden. Die Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben und beinhalteten die Zelllyse, Beladungs- und Filtrationsschritte

an Zentrifugensäulen sowie die Eluierung der DNA von der Zentrifugenmembran (siehe Abb. 7) [Shedlock *et al.* 1997].



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Mini Kit. Nach Probenlyse und Bindung des genomischen Materials an der Zentrifugenmembran folgen mehrere Waschschrte. Abschließend wird die Proben-DNA durch Elution von der Membran isoliert [modifiziert nach QIAamp DNA Mini Kit Handbook 04/2010 S.13].

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mittels Photometer (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Uppsala) bestimmt und für nachfolgende Analyseverfahren angeglichen (siehe Kapitel 4.2.1). Zudem erfolgten Agarose-Gelelektrophoresen zur Einschätzung der DNA vorliegender Proben (siehe Kapitel 4.2.2).

### 3.4 MLPA - Verfahren

Die vorliegenden Medulloblastomproben wurden hinsichtlich ihrer Kopienzahlveränderungen sowie Methylierungen der Promotorregionen von Tumorsuppressorgen mittels MLPA-Verfahren (siehe Kapitel 1.6.2) untersucht. Dafür kamen insgesamt drei kommerzielle Kits der Firma MRC Holland zum Einsatz. Die zu analysierenden Gene wurden im Anhang entsprechend ihrer Funktion aufgelistet.

#### 3.4.1 Verwendeter Onkogen-Kit

Um Veränderungen der Kopienzahl im Genstatus von Medulloblastomzellen zu ermitteln, wurden Gene untersucht, die bekannterweise in Tumoren häufig amplifiziert oder deletiert erscheinen. Um die Genanalyse durchzuführen, wurde der MLPA-Kit P173 Gain-3 verwendet, welcher insgesamt 43 MLPA-Proben in Form von Oligonukleotiden sowie verschiedene Kontrollproben beinhaltet. Das PCR-Verfahren, bereits in Absatz 1.6.2.1 näher beschrieben, wurde entsprechend eines dafür konzipierten, auf Herstellerempfehlungen beruhenden Protokolls durchgeführt. Nach Abschluss der MLPA-Reaktion erfolgte die Visualisierung der Amplifizierungsprodukte mittels LICOR-Gelelektrophorese.

Für die Beurteilung des Kopienzahlstatus konnten 43 Genloci untersucht werden (siehe Tab. 4). Einige der analysierten Gene fanden im verwendeten Onkogen-Kit mehrfach Repräsentation. In Anbetracht dessen konnten 26 verschiedene Gene verzeichnet werden. Bei einem Umfang von 25 Tumorproben waren bis zu 650 mögliche Datenpunkte generierbar (siehe Kapitel 4.4).

**Tabelle 4:** Gendetektion mittels MLPA-Kit P173 Gain-3

| Gen      | Locus    | Gen     | Locus   |
|----------|----------|---------|---------|
| NRAS     | 1p13.2   | IGF1R   | 15q26   |
| IGF1R    | 15q26    | NTRK1   | 1q23.1  |
| IGFBP2   | 2q35     | IGFBP2  | 2q35    |
| IGFBP5   | 2q35     | BCL2L11 | 2q13    |
| PIK3CA   | 3q26.3   | NTRK3   | 15q25.3 |
| PIK3CA   | 3q26.3   | NTRK2   | 9q21.33 |
| TOM1L2   | 17p11.2  | PIK3CA  | 3q26.3  |
| NFKBIE   | 6p21.1   | BRAF    | 7q34    |
| PDGFRA   | 4q11     | RUNX1   | 21q22.3 |
| BIRC5    | 17q25    | JAK2    | 9p24    |
| SERPINB9 | 6p25.2   | IGF1R   | 15q26   |
| CYP27B1  | 12q13.3  | TOM1L2  | 17p11.2 |
| IGF1R    | 15q26    | JAK2    | 9p24    |
| SERPINB2 | 18q21.3  | ERBB4   | 2q33    |
| PPM1D    | 17q23.3  | RUNX1   | 21q22.3 |
| FGF4     | 11q13    | BRAF    | 7q34    |
| BIRC5    | 17q25    | CYP27B1 | 12q13.3 |
| PIK3C2B  | 1q32     | NTRK3   | 15q25.3 |
| IGFBP4   | 17q21.2  | NRAS    | 1p13.2  |
| SERPINB7 | 18q21.33 | NTRK2   | 9q21.33 |
| IRS2     | 13q34    | NTRK1   | 1q23.1  |
| PIK3C2B  | 1q32     |         |         |

### 3.4.2 Verwendete Tumorsuppressorgen-Kits

Um zusätzlich zu Kopienzahlveränderungen auch den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgen in Medulloblastomzellen zu ermitteln, wurden weitere Analysen mit den MS-MPLA-Kits ME001-C1 TS-1 und ME002-A1 TS-2 durchgeführt. Beide Sets beinhalten jeweils 41 Proben, je 26 bzw. 27 MLPA-Proben sowie 15 bzw. 14 Referenz-

proben zur Verifizierung der PCR-Produkte (siehe Tab. 5 und 6). Das MS-MLPA-Verfahren, in Absatz 1.6.2.2 näher erläutert, wurde nach einem dafür vorgesehenen Protokoll durchgeführt. In anschließender Visualisierung mittels LICOR-Gelelektrophorese ergab sich für jede zu untersuchende Tumorprobe eine Aussage zum Kopienzahl- sowie Methylierungsstatus.

**Tabelle 5:** Gendetektion mittels Tumorsuppressorgenkit ME001-C1 TS-1

| <b>Gen</b>     | <b>Locus</b> | <b>Gen</b>    | <b>Locus</b> |
|----------------|--------------|---------------|--------------|
| CASR           | 3q21         | <b>PTEN</b>   | 10q23.3      |
| CTNNB1         | 3p21.3       | TSC2          | 16p13.3      |
| <b>MLH1</b>    | 3p22.1       | <b>CDKN1B</b> | 12p13.2      |
| <b>GSTP1</b>   | 11q13        | <b>CASP8</b>  | 2q33.2       |
| TNFRSF7        | 12p13.31     | BCL2          | 18q21.33     |
| <b>CDH13</b>   | 16q23.3      | <b>BRCA1</b>  | 17q21.31     |
| <b>IGSF4</b>   | 11q23        | <b>CHFR</b>   | 12q24.33     |
| BRCA2          | 13q12.3      | PAH           | 12q23        |
| <b>FHIT</b>    | 3p14.2       | <b>HIC1</b>   | 17p13.3      |
| <b>TP73</b>    | 1p36.32      | <b>CDKN2B</b> | 9p21         |
| KLK3           | 19q13.33     | MLH3          | 14q24.3      |
| <b>RASSF1A</b> | 3p21.3       | <b>RARB</b>   | 3p24.2       |
| <b>ESR1</b>    | 6q25.1       | <b>ATM</b>    | 11q23        |
| AI651963       | 10p14        | TNFRSF1A      | 12p13.31     |
| <b>VHL</b>     | 3p25.3       | <b>MLH1</b>   | 3p22.3       |
| <b>DAPK1</b>   | 9q22         | <b>CDKN2A</b> | 9p21         |
| CDH1           | 16q22.1      | PARK2         | 6q26         |
| <b>RASSF1A</b> | 3p21.3       | <b>APC</b>    | 5q22         |
| <b>CD44</b>    | 11p12        | <b>TIMP3</b>  | 22q12.3      |
| CDK6           | 7q21.3       | CREM          | 10p12.1      |
| <b>BRCA2</b>   | 13q12.3      |               |              |

Fettgedruckte Gene können auf Methylierungen untersucht werden.

Die o.g. Referenzproben entsprachen Zielgenen ohne Erkennungssequenz für die verfahrenstypische Restriktionsendonuklease (nähere Erläuterungen siehe Kapitel 1.6.2.2), sodass sie nicht auf ihr Methylierungsverhalten untersucht werden konnten. Eine Berücksichtigung bei der quantitativen Ermittlung von Kopienzahlveränderungen war jedoch möglich. Hinsichtlich des Kopienzahlstatus konnten aus 82 Genloci (jeweils 41 aus

TSG-Kit 1 und TSG-Kit 2) insgesamt 51 verschiedene Gene herausgearbeitet werden. Bei einem Probenumfang von 25 Tumoren wurden 1275 Datenpunkte generiert (siehe Kapitel 4.4).

**Tabelle 6:** Gendetektion mittels Tumorsuppressorgenkit ME002-A1 TS-2

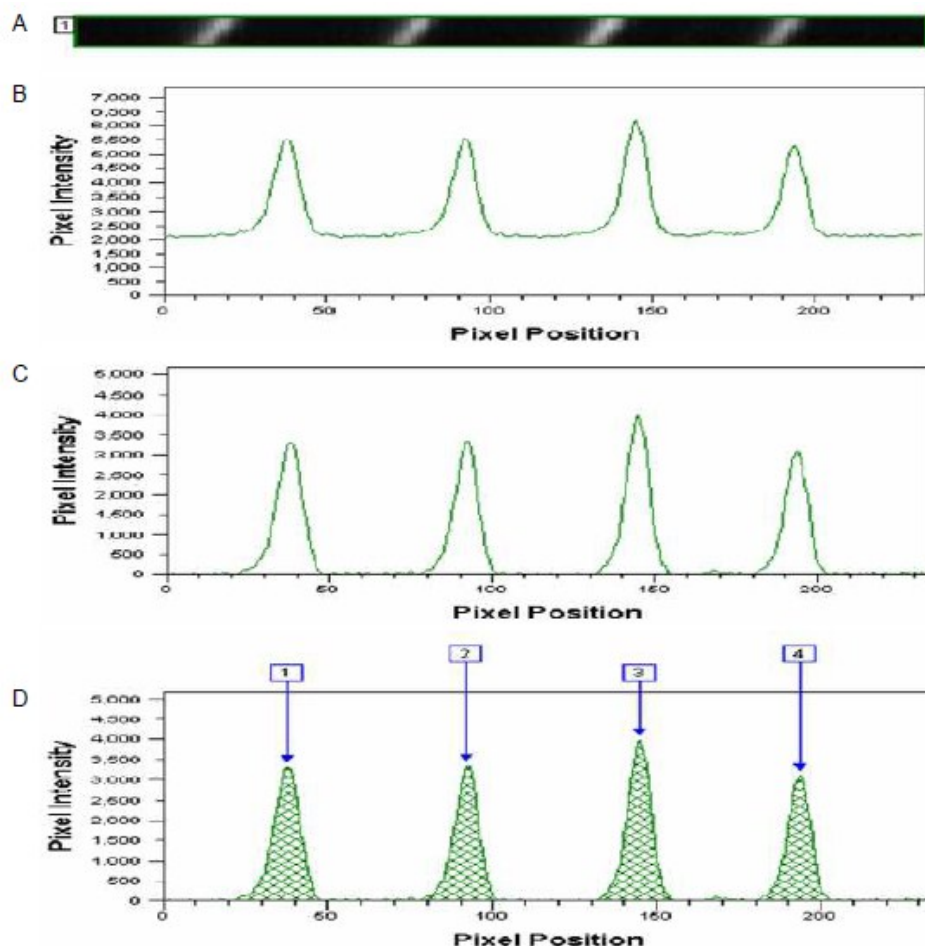
| Gen           | Locus    | Gen          | Locus    |
|---------------|----------|--------------|----------|
| CASR          | 3q21     | <b>CHFR</b>  | 12q24.33 |
| <b>RB1</b>    | 13q14.2  | TSC2         | 16p13.3  |
| <b>CD44</b>   | 11p12    | <b>GSTP1</b> | 11q13    |
| <b>RARB</b>   | 3p24     | <b>VHL</b>   | 3p25.3   |
| IL2           | 4q26     | PMP22        | 17p12    |
| <b>GATA5</b>  | 20q13.33 | <b>WT1</b>   | 11p13    |
| <b>CDKN2A</b> | 9p21     | <b>TP73</b>  | 1p36     |
| ATM           | 11q23    | PAH          | 12q23    |
| <b>CDKN2B</b> | 9p21     | <b>CDH13</b> | 16q24.2  |
| <b>ASC</b>    | 16p12    | <b>PAX5A</b> | 9p13     |
| PARK2         | 6q26     | MLH3         | 14q24.3  |
| <b>MGMT</b>   | 10q26    | <b>MGMT</b>  | 10q26    |
| <b>IGSF4</b>  | 11q23    | <b>PTEN</b>  | 10q23.3  |
| PTEN          | 10q23.3  | PTCH         | 9q22.3   |
| <b>IGSF4</b>  | 11q23    | <b>TP53</b>  | 17p13.1  |
| <b>THBS1</b>  | 15q15    | <b>ATM</b>   | 11q23    |
| APC           | 5q22     | PARK2        | 6q26     |
| <b>MSH6</b>   | 2p16     | <b>BRCA2</b> | 13q12.3  |
| <b>RB1</b>    | 13q14.2  | <b>BRCA1</b> | 17q21    |
| TNXB          | 6p21.3   | CREM         | 10p12.1  |
| <b>ESR1</b>   | 6q25.1   |              |          |

Fettgedruckte Gene können auf Methylierungen untersucht werden.

Hinsichtlich des Methylierungsstatus konnten nach Abzug der Referenzproben 53 Gene (26 Gene durch TSG-Kit 1 und 27 Gene durch TSG-Kit 2) analysiert werden. Einige Tumorsuppressorgene wurden, nicht zuletzt durch die Verwendung zweier Kits, mehrfach auf Promotorhypermethylierungen untersucht (siehe Tab. 5 und 6). Bei einem Umfang von 25 Tumorproben konnten für 33 verschiedene TSGs insgesamt 825 Datenpunkte zur qualitativen Beurteilung des Methylierungsstatus erhoben werden (siehe Kapitel 4.5).

### 3.5 Densitometrische Auswertung

Nach Beendigung der MLPA-Verfahren und gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurden die entstandenen Banden der Proben, die später hinsichtlich ihrer Kopienzahländerungen untersucht werden sollten, mit dem densitometrischen Auswertungsprogramm ImageMaster (TotalLab 1D) analysiert. Hierzu wurden die Signalstärken in Form eines Zahlenwertes ausgedrückt (siehe Abb. 8) und die detektierten Grauwerte in Abhängigkeit von Pixelposition und -intensität grafisch dargestellt. Von der entstandenen Kurve wurden nach Subtraktion der Hintergrundsignale die Signalstärken der einzelnen Banden als Fläche unter der Kurve erfasst und als Zahlenwert ausgedrückt. Unter Berücksichtigung von Lage und Anzahl der detektierten Messpunkte entstanden somit quantitative Ergebnisse für die weitere statistische Auswertung.



**Abbildung 8:** Darstellung der densitometrischen Auswertung von 4 Ausgangssignalen. Nach Auftrennung der PCR-Produkte mittels LICOR-Gelelektrophorese (A) wird die Stärke der Grausignale als Zahlenwert (Pixelintensität) erfasst (B). Nach Subtraktion der Hintergrundsignale (C) ergibt sich die quantitative Signalstärke als Fläche unter der Kurve (D) [nach Hoffmann 2008].

### 3.6 Auswertung der Aberrationen

Für die quantitative Detektion von Kopienzahlveränderungen mussten zunächst Grenzbereiche für Deletionen und Amplifikationen bestimmt werden. Die ermittelten Signalstärken lagen vorrangig im numerischen Bereich von 0,7 bis 1,3. Diese Grenzwerte deckten sich mit den Ergebnissen von Schouten *et al.*, weshalb in der Auswertung von Aberrationen Signalwerte von  $x < 0,7$  als Deletion und Signalwerte von  $x > 1,3$  als Amplifikation definiert wurden. Die dazwischen liegende Werte von  $0,7 < x < 1,3$  wurden als fehlende Aberration gewertet. Für fehlende Banden wurde der Ausdruck „no value“ gebraucht [Schouten *et al.* 2002]. Für die Gesamtheit aller densitometrisch erhobenen Originaldaten einer DNA-Sequenz wurde der Median ermittelt und zum jeweiligen Einzelwert der Tumorprobe ins Verhältnis gesetzt, sodass der Anteil einer Bande am Gesamtsignal bestimmt werden konnte. Daraufhin wurden die Signalanteile nach oben angeführten Kriterien beurteilt und abschließend in einer Gesamttabelle hinsichtlich ihres Kopienzahlstatus aufgeführt. Zudem fand die gesteigerte Aussagekraft einer mehrfachen Genanalyse bei den Berechnungen hinsichtlich möglicher Aberrationen Berücksichtigung. Bei Vorliegen von zwei oder mehr Werten für ein Gen wurde aus den jeweiligen Verhältniswerten der Median gebildet, welcher für die weitere Beurteilung von Genaberrationen verwendet werden konnte.

Der Methylierungsstatus konnte ohne densitometrische Analyse erhoben werden. Es erfolgte eine qualitative Bewertung der relevanten Banden eines Gelauftrages. In einer binären Entscheidung wurde einem vorhandenen Bandensignal der Wert 1 zugeordnet, ein fehlender Signalnachweis wurde mit dem Wert 0 versehen.

### 3.7 Statistische Beurteilung

Die statistische Beurteilung der ermittelten Genaberrationen sowie deren klinische Korrelation wurde mit Unterstützung von Dr. rer. nat. M. Walther (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena) durchgeführt.

Ausgehend von zwei zu vergleichenden, unabhängigen Grundgesamtheiten wurden verschiedene Testverfahren eingesetzt. Für die jeweiligen Betrachtungen wurden die Stichproben mittels Shapiro-Wilk-Tests zunächst auf Normalverteilung geprüft.

Der Vergleich von Kopienzahlveränderungen und Methylierungen der verschiedenen Probengruppen erfolgte mithilfe des parameterfreien Mann-Whitney-Tests, auch U-Test

genannt. Dieser Signifikanztest für unverbundene Stichproben unterschiedlichen Umfangs, die nicht zwingend der Normalverteilung unterliegen müssen, betrachtet neben Medianwerten auch Ranginformationen der Probenumfänge. Dazu wurden die erhobenen Messwerte der Reihenfolge nach sortiert, nummeriert und anschließend auf ihr Signifikanzverhalten geprüft ( $H_0$ =Stichproben sind gleich, 95%-Konfidenzintervall, Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$  einseitig getestet,  $\alpha=2,5\%$  zweiseitig getestet) [Bortz und Lienert 2008].

Mittels statistischer Trendanalyse konnten Aussagen über häufig beobachtete Aberrationen einzelner Gene und Proben getroffen werden.

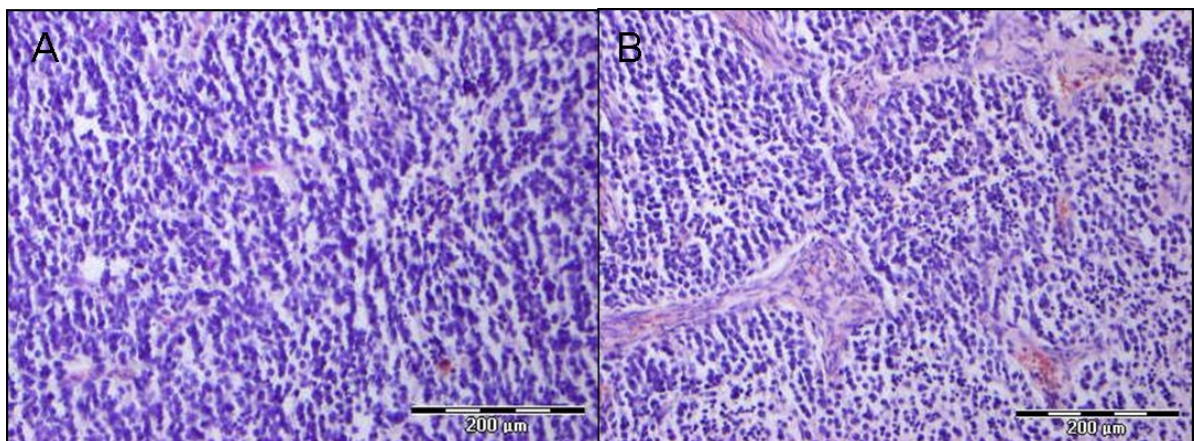
Für die Bewertung eventuell bestehender klinischer Korrelationen wurde neben dem U-Test auch der Exakte Fischer-Test, eine Form des  $\chi^2$ -Tests für einen kleinen Stichprobenumfang, verwendet. Durch eine Verhältnisanalyse eignete sich dieser Signifikanztest zur Untersuchung des Zusammenhangs von einzelnen Genexpressionen mit einem spezifischen klinischen Merkmal. Dieser Vierfeldertest für ungepaarte Stichproben, mit dem der p-Wert als Prüfgröße direkt bestimmt werden kann, ermöglichte auch bei geringen Beobachtungszahlen valide Ergebnisse hinsichtlich der Untersuchung auf Probengleichheit ( $H_0$ =Stichproben sind gleich, 95%-Konfidenzintervall, Signifikanzniveau  $\alpha=2,5\%$  zweiseitig getestet) [Weiß 2010].



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histopathologische Beurteilung

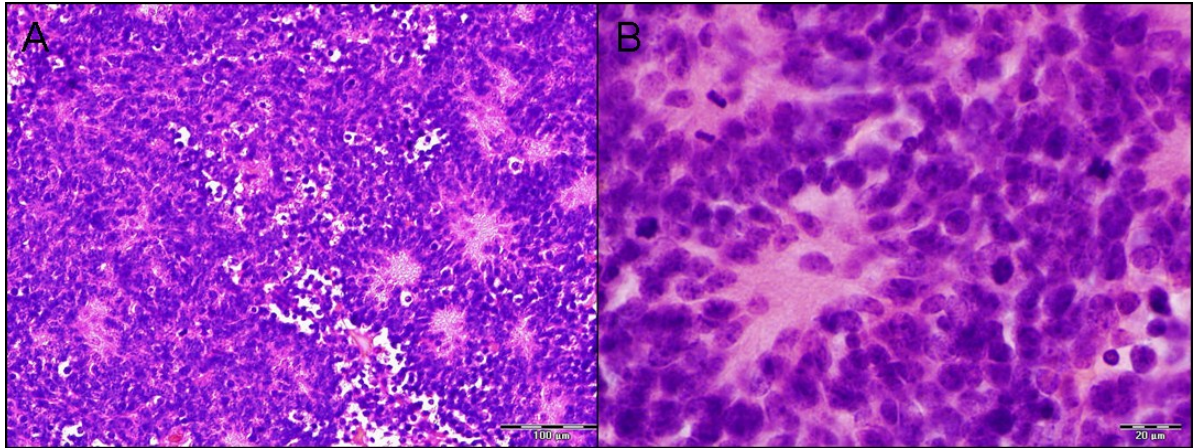
Die histopathologische Beurteilung der Tumorproben und Charakterisierung der zu untersuchenden Tumorregionen erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. B. Romeike (Institut für Pathologie Arbeitsbereich Neuropathologie des Universitätsklinikums Jena). Hierbei wurde in allen Paraffin-eingebetteten Proben repräsentatives Tumormaterial gefunden. So zeigte beispielsweise das Schnittpräparat P4 (siehe Abb. 9A) einen kleinzelligen Tumor mit pallisadenartig aufgestellten Zellen, welche sich durch karottenförmige, hyperchromatische Zellkerne auszeichneten. Der histologische Schnitt der Probe P5 (siehe Abb. 9B) imponierte durch ein axiales, infiltratives Tumorwachstum mit Aussparung des Stratum moleculare sowie durch vereinzelte Nekroseareale. Zusätzlich waren kleine, dünnwandige Blutgefäße entsprechend einer, für Medulloblastome relativ seltenen, vaskulären Hyperproliferation zu verzeichnen [Giangaspero *et al.* 2007].



**Abbildung 9:** Histopathologische Darstellung von Medulloblastomen

(A) Schnittpräparat Medulloblastom P4 bei 100facher Vergrößerung in HE-Färbung. (B) Schnittbild Medulloblastom P5 bei 100facher Vergrößerung in HE-Färbung [Institut für Pathologie Universitätsklinikum Jena, Probe P4 & P5].

Das Präparat der Paraffinprobe 8 zeichnete sich durch die Darstellung eines zellreichen, hoch mitotischen Tumors mit deutlicher Hyperchromasie aus. Die für Medulloblastome typischen Horner-Wright-Rosetten konnten klar differenziert werden (siehe Abb. 10A und 10B) [Giangaspero *et al.* 2007]. Zudem waren zahlreiche Mitosefiguren erkennbar (Abb. 10B).



**Abbildung 10:** Histopathologische Darstellung von Medulloblastomen  
Darstellung von Horner-Wright-Rosetten in (A) Schnittpräparat Medulloblastom P8 bei 200facher und (B) 630facher Vergrößerung in HE-Färbung [Institut für Pathologie Universitätsklinikum Jena, Probe P8].

#### 4.2 *Qualität der Tumorproben*

Nach Isolierung der DNA aus den vorliegenden Primärtumoren wurde der gesamte Probenumfang sowohl quantitativ als auch qualitativ beurteilt.

##### 4.2.1 Konzentrationsmessung

Die Bestimmung der Ausgangskonzentrationen der aufgereinigten DNA von Primärtumoren und bereits vorliegenden DNA-Aufarbeitungen von Zellkulturlinien ergab zunächst Werte von 64 bis 1276 ng/μl. Die höchsten Konzentrationen konnten für die Paraffinproben (vor allem P1, P3 und P4) erhoben werden. Die Werte für die untersuchten Zelllinien unterlagen mit einem Mittelwert von 130 ng/μl (Minimum 93 ng/μl, Maximum 193 ng/μl) den geringsten Schwankungen. Die Höhe der ermittelten Ausgangskonzentrationen korrelierte mit den Signalintensitäten der anschließend durchgeführten Agarose-Gelelektrophoresen (siehe Abb. 11). Um in nachfolgenden Analyseverfahren vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden, soweit dies möglich war, durch einen Verdünnungsansatz die Ausgangswerte an eine Endkonzentration von 100 ng/μl angeglichen. Für Proben mit einer geringeren Ausgangskonzentration (P6, T27 sowie Z1) wurde auf ein Aufkonzentrieren verzichtet und der ermittelte Wert als Endkonzentration festgelegt. Die erhobenen Messwerte wurden in Tabelle 7 zusammengetragen.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Konzentrationsmessung und Werte für die Konzentrationsangleichung der Proben-DNA

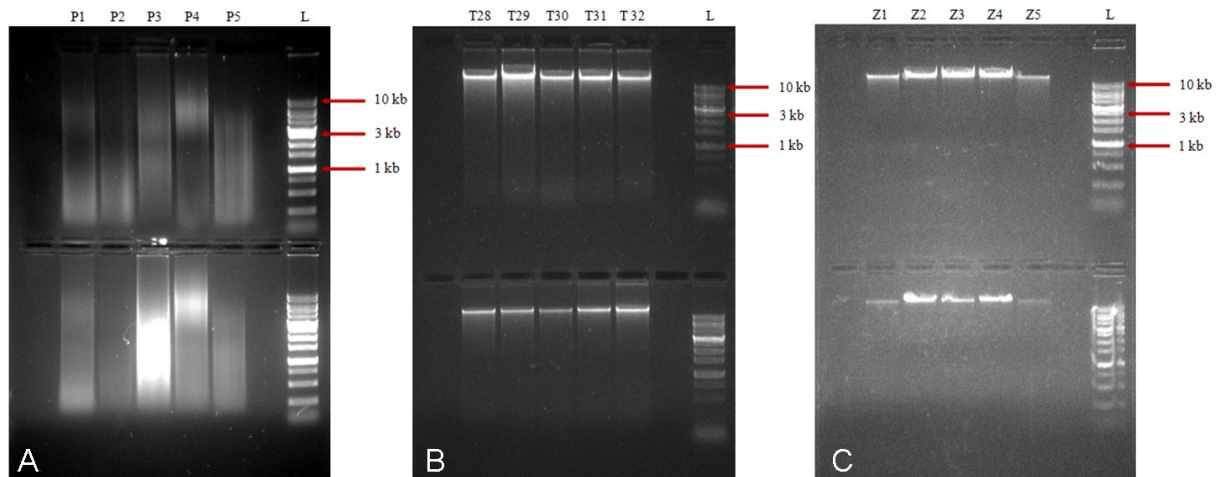
| Probe | Ausgangsmenge<br>in mg | Ausgangskonzentration in<br>ng/μl | Ratio | Endkonzentration in<br>ng/μl | DNA in μl für<br>30 μl mit 100 ng/μl | H2O in μl für<br>30 μl mit 100 ng/μl |
|-------|------------------------|-----------------------------------|-------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| P1    | 26,3                   | 516                               | 1,78  | 100                          | 6,0                                  | 24,0                                 |
| P2    | 26,6                   | 219                               | 1,80  | 100                          | 13,5                                 | 16,5                                 |
| P3    | 26,4                   | 1276                              | 1,68  | 100                          | 2,5                                  | 27,5                                 |
| P4    | 26,6                   | 684                               | 1,73  | 100                          | 4,5                                  | 25,5                                 |
| P5    | 26,6                   | 242                               | 1,72  | 100                          | 12,5                                 | 17,5                                 |
| P6    | 26,0                   | 88                                | 1,55  | 88                           | 30,0                                 | 0,0                                  |
| P7    | 7,8                    | 181                               | 1,69  | 100                          | 16,5                                 | 13,5                                 |
| P8    | 24,5                   | 287                               | 1,67  | 100                          | 10,5                                 | 19,5                                 |
| T21   | 30,2                   | 217                               | 1,70  | 100                          | 14,0                                 | 16,0                                 |
| T22   | 28,2                   | 182                               | 1,68  | 100                          | 16,5                                 | 13,5                                 |
| T23   | 21,8                   | 175                               | 1,67  | 100                          | 17,0                                 | 13,0                                 |
| T24   | 34,9                   | 103                               | 1,80  | 100                          | 29,0                                 | 1,0                                  |
| T25   | 29,4                   | 128                               | 1,70  | 100                          | 23,0                                 | 7,0                                  |
| T26   | 34,8                   | 705                               | 1,65  | 100                          | 4,0                                  | 26,0                                 |
| T27   | 25,1                   | 64                                | 1,81  | 64                           | 30,0                                 | 0,0                                  |
| T28   | 27,3                   | 186                               | 1,70  | 100                          | 16,0                                 | 14                                   |
| T29   | 33,0                   | 130                               | 1,8   | 100                          | 23,0                                 | 7,0                                  |
| T30   | 27,3                   | 112                               | 1,73  | 100                          | 27,0                                 | 3,0                                  |
| T31   | 33,0                   | 167                               | 1,78  | 100                          | 18,0                                 | 12                                   |
| T32   | 30,1                   | 268                               | 1,61  | 100                          | 11,0                                 | 19                                   |
| Z1    | -                      | 93                                | 0,74  | 93                           | 30,0                                 | 0,0                                  |
| Z2    | -                      | 139                               | 0,81  | 100                          | 21,5                                 | 8,5                                  |
| Z3    | -                      | 124                               | 0,87  | 100                          | 24,0                                 | 6,0                                  |
| Z4    | -                      | 193                               | 0,81  | 100                          | 15,5                                 | 14,5                                 |
| Z5    | -                      | 102                               | 0,67  | 100                          | 29,5                                 | 0,5                                  |

#### 4.2.2 Gelelektrophoretische Auswertung

Zur Einschätzung der DNA-Beschaffenheit der vorliegenden Proben wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt (siehe Abb. 11). Diese zeigten für alle Proben Bandenmuster, sodass die Extraktion des genetischen Materials generell als erfolgreich gewertet werden konnte. Da für jede DNA-Probe die Ausgangs- und Endkonzentration dargestellt wurde, konnten die Gelelektrophorese-Bilder in korrespondierende Abschnitte untergliedert werden.

Die verschiedenen Signalstärken aufgetragener Banden gaben einen Hinweis auf die Quantität der extrahierten DNA. Hierbei entsprach eine erhöhte Signalintensität einem erhöhten DNA-Konzentrationsgehalt, was mit den vorausgegangenen Konzentrationsmessungen korrelierte. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den jeweiligen Abschnitten der Gelbilder. Im unteren Anteil (Auftrag der Ausgangskonzentrationen) konnten für alle Proben Intensitätsschwankungen verzeichnet werden, wobei die Paraffinblöcke die größten Signalabweichungen aufwiesen. Besonders die Proben P3 und P4 imponierten durch ihre deutlich erhöhte Signalstärke. Nach dem Konzentrationsangleich zeigten obere Bildabschnitte (Auftrag der Endkonzentrationen) für den gesamten Probenumfang annähernd gleiche Bandenintensitäten.

Die Qualität der einzelnen Proben konnte mithilfe einer Kontrollbande zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente eruiert werden. Hierbei bestätigte sich die Vermutung hochmolekularer DNA in den Reihen der Zellkulturlinien. Die Fragmente fanden sich in einem Bereich von mehr als 10 kb wieder und erwiesen sich aufgrund einer geringen Schmierbildung als nahezu undegradiert. Das genetische Material der Kryokonservate zeigte ein dazu ähnliches Bild. Die Qualität der Paraffin-eingebetteten Proben erwies sich dagegen als stark schwankend mit Fragmentgrößen von etwa 1 bis 3 kb, welche auf das Vorhandensein niedermolekularer DNA hindeuteten. Zudem konnte eine starke Schmierbildung detektiert werden, was eine Degradierung des genetischen Materials vermuten ließ.



**Abbildung 11:** Agarose-Gelelektrophoresen isolierter Tumor-DNA

(A) Gelelektrophorese der DNA der Paraffinblöcke P1 - P5. Auftrag einer 1 kb DNA-Leiter ("L") zur Größenbestimmung. (B) Gelelektrophorese der DNA der Kryokonservierungen T28 - T32 mit Auftrag einer 1 kb DNA-Leiter ("L"). (C) Gelelektrophorese der Zellkulturlinien-DNA Z1 - Z5 sowie Auftrag einer 1kb DNA-Leiter ("L").

#### 4.3 Visualisierung der MLPA-Reaktion

Die Genprodukte der MLPA-Reaktionen wurden mittels LICOR-Gelelektrophorese visualisiert. Mithilfe des Onkogenkits P173 konnten 43 Genprodukte untersucht werden. Die Tumorsuppressorkits 1 und 2 ermöglichten die Analyse von 82 Genloci (jeweils 41 in TSG-Kit 1 und TSG-Kit 2), sodass insgesamt 125 Genbanden beurteilt werden konnten. Die waagerechte Anordnung entsprach der Anzahl und Reihenfolge der untersuchten Tumorproben. Die senkrechte Anordnung der Banden resultierte aus der größenabhängigen Auftrennung der Genprodukte beginnend mit der kürzesten Sequenz am unteren Bildrand aufsteigend mit einem jeweiligen Abstand von 6 bis 11 bp. Die Größe der Genprodukte differierte zwischen 130 und 472 Basenpaaren für den verwendeten Onkogenkit sowie 136 und 481 Basenpaaren für die TSG-Kits. Neben der Zuordnung der Banden zu den einzelnen Genprodukten konnten durch Kontrollbanden im Gelauftrag Aussagen zur DNA-Quantität, zum Ligationsergebnis sowie zum Denaturierungs- und Hybridisierungserfolg getroffen werden. Aufgrund des Umfangs dieser Abschnitte wurde in den folgenden Abbildungen (Abb. 12 - 16) auf die Darstellung dieser Bereiche verzichtet.

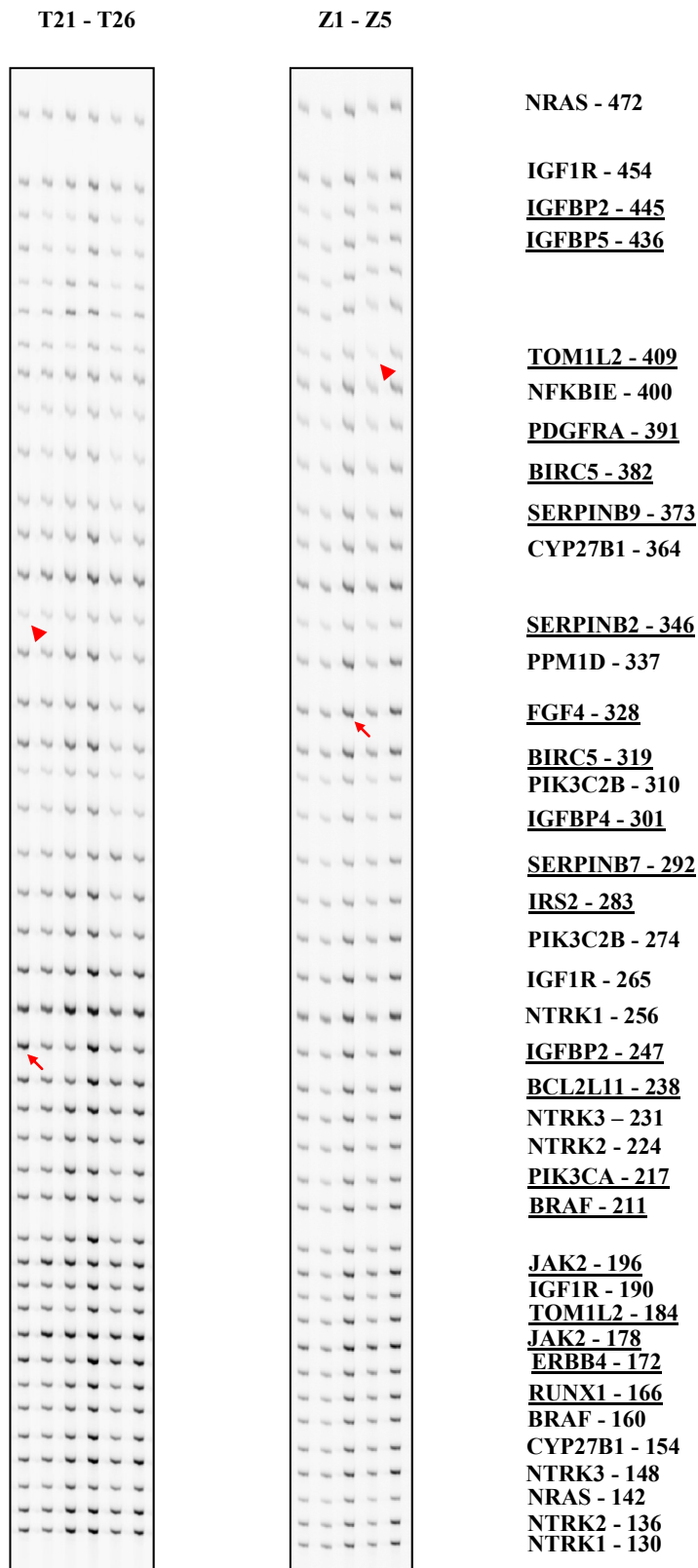
Hinsichtlich des Kopienzahlstatus konnten die Visualisierungen aller 125 Genbanden in die Beurteilung einfließen. Einige Aberrationen waren bereits ohne densitometrische Auswertung erkennbar. Eine deutlich abgeschwächte Signalintensität der Genprodukte konnte als Hinweis auf eine Kopienzahlverminderung im Sinne einer Deletion gewertet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei signalintensiven Genbanden eine

Kopienzahlerhöhung entsprechend einer Amplifikation vermutet werden (siehe Abb. 12, 13 und 15). Für weitere Schlussfolgerungen mit statistischer Aussagekraft wurden die Ergebnisse einer densitometrischen Auswertung unterzogen.

Der Methylierungsstatus ließ sich mithilfe der 82 Genbanden der Tumorsuppressorkits 1 und 2 analysieren. Bei der Beurteilung einzelner Gene stellte sich eine mögliche Methylierung durch einen zusätzlichen Bandenauftrag dar (siehe Abb. 14 und 16). Jedoch konnten nicht alle auf Kopienzahlveränderungen untersuchten Gene hinsichtlich möglicher Methylierungen beurteilt werden. Aufgrund der Bindungsspezifität der beinhalteten Methylgruppen-sensitiven Endonuklease blieben für die verwendeten TSG-Kits 15 bzw. 14 Genbanden ohne Aussagekraft. Sie eigneten sich jedoch als Referenzbanden, was in den Abbildungen 14 und 16 verdeutlicht wird. Folglich konnten nur 53 Gene (26 Gene durch TSG-Kit 1 und 27 Gene durch TSG-Kit 2) auf Promotormethylierungen untersucht werden. Durch die Möglichkeit der guten optischen Differenzierung erfolgte in Anbetracht späterer statistischer Beurteilungen eine subjektive Erhebung des Methylierungsstatus.

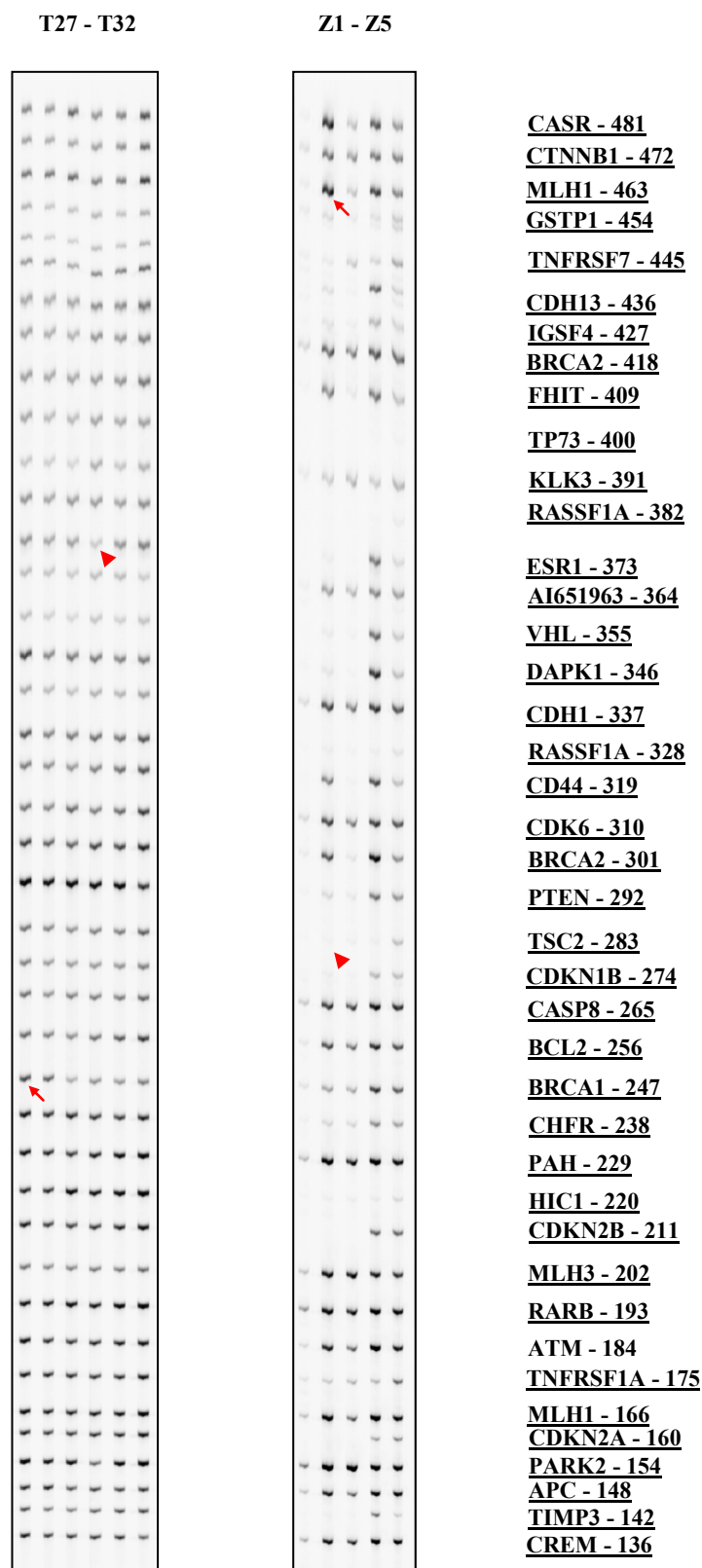
In den Gelbildern traten vereinzelt Höhenunterschiede innerhalb der Signalbanden auf, welche auf unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten während der Elektrophorese zurückzuführen sind. Zudem konnten gelegentlich Überlagerungsartefakte geringerer Intensität zwischen den Laufbanden ermittelt werden.





**Abbildung 12:** LICOR-Gelbilder der Kryokonservate T21 - T26 sowie Z1 - Z5 zur P173 Gain-Kopienzahlanalyse.

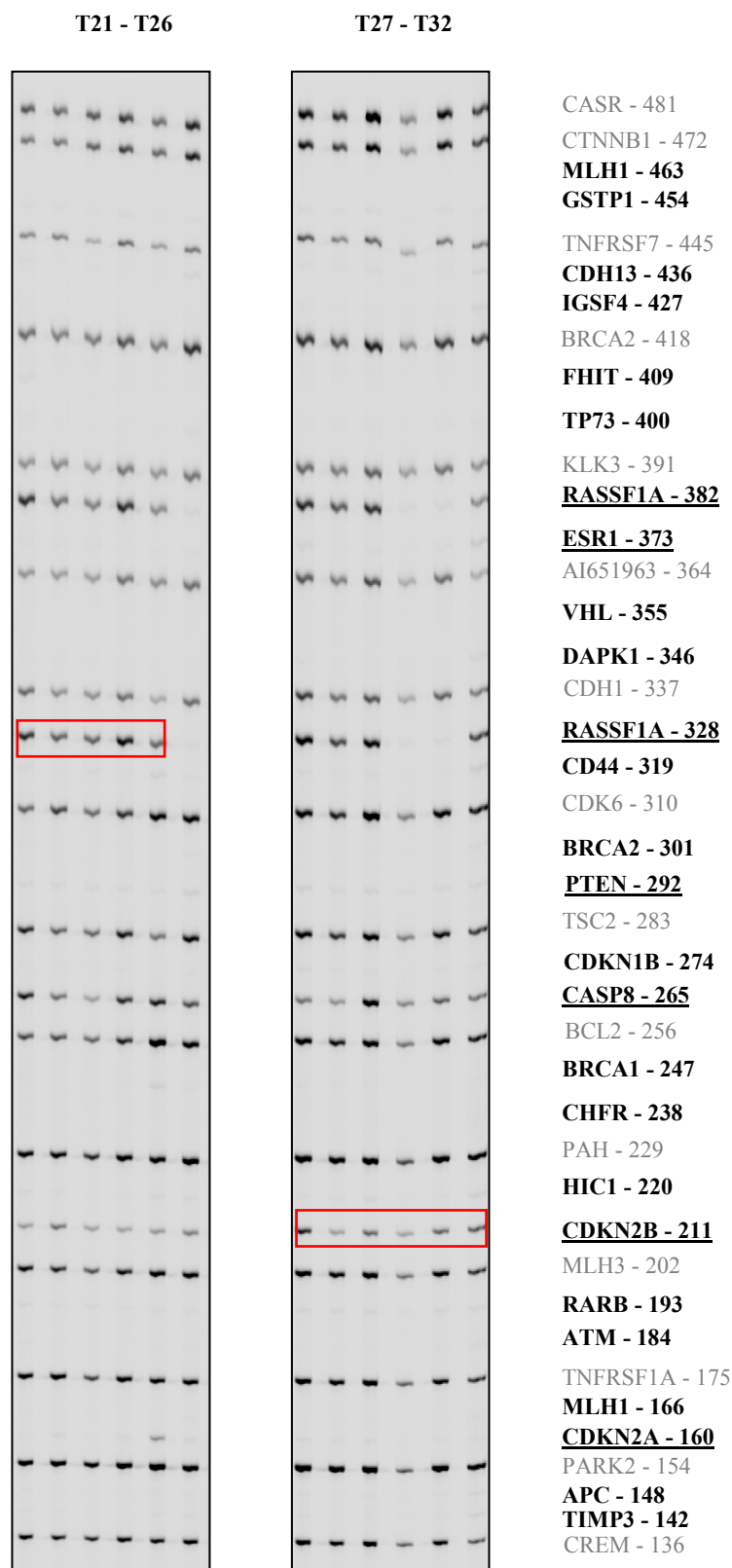
Waagerechter Auftrag der einzelnen Tumorproben. Senkrechter Bandenauftrag entsprechend der Basenpaargröße. Die hinsichtlich ihres Kopienzahlstatus zu untersuchenden Gene sind fett gedruckt, Genbanden mit Aberrationsnachweis im Sinne einer Kopienzahlerhöhung oder -minderung sind zudem unterstrichen. Beispielhafte Markierung möglicher Amplifikationen (Pfeil ↗) und Deletionen (Dreieck ▼).



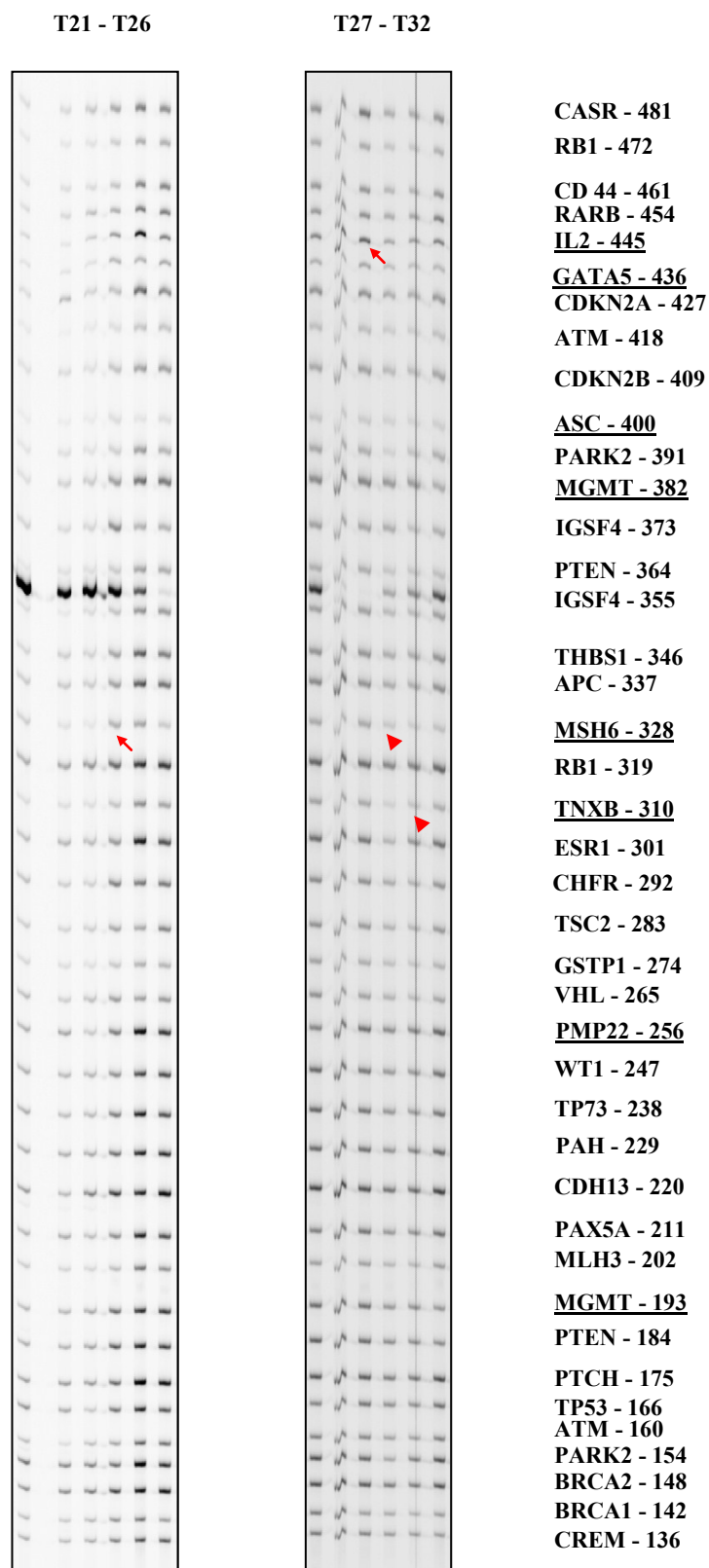
**Abbildung 13:** LICOR-Gelbilder der Kryokonservate T27 - T32 sowie Z1 - Z5 zur TSG1-Kopienzahlanalyse.

Waagerechter Auftrag der einzelnen Tumorproben. Senkrechter Bandenauftrag entsprechend der Basenpaargröße. Die hinsichtlich ihres Kopienzahlstatus zu untersuchenden Gene sind fett gedruckt, Genbanden mit Aberrationsnachweis im Sinne einer Kopienzahlerhöhung oder -minderung sind zudem unterstrichen. Beispielhafte Markierung möglicher Amplifikationen (Pfeil ↘) und Deletionen (Dreieck ▼).

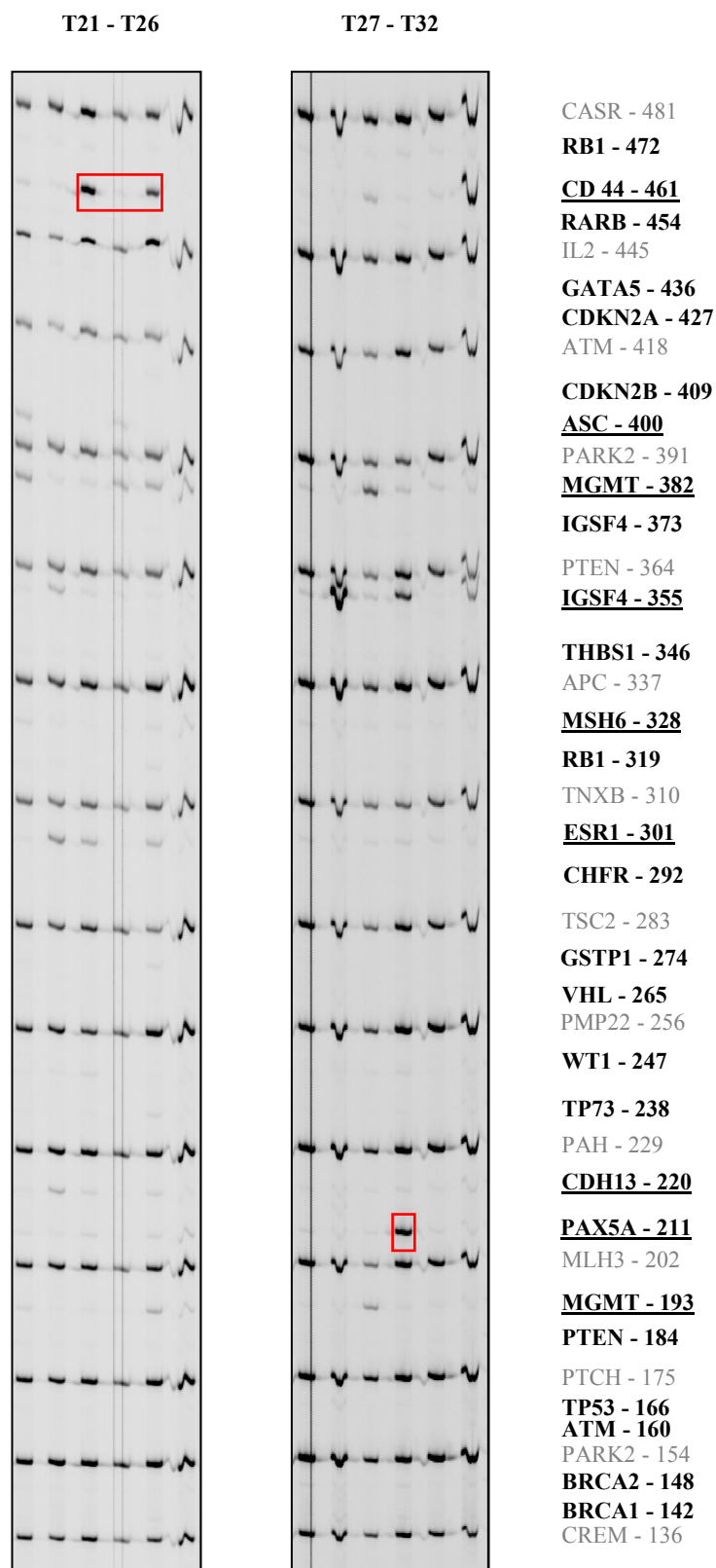




**Abbildung 14:** LICOR-Gelbild der Kryokonservate T21 - T32 zur TSG1-Methylierungsanalyse. Waagerechter Auftrag der einzelnen Tumorproben. Senkrechter Bandenauftrag entsprechend der Basenpaargröße. Referenzbanden sind grau markiert. Die hinsichtlich ihres Methylierungsstatus zu untersuchenden Gene sind fett gedruckt, Genbanden mit Methylierungsnachweis sind zudem unterstrichen. Beispielhafte Markierung möglicher Methylierungen (Rahmen □).



**Abbildung 15:** LICOR-Gelbild der Kryokonservate T21 - T32 zur TSG2-Kopienzahlanalyse. Waagerechter Auftrag der einzelnen Tumorseiten. Senkrechter Bandenauftrag entsprechend der Basenpaargröße. Die hinsichtlich ihres Kopienzahlstatus zu untersuchenden Gene sind fett gedruckt, Genbanden mit Aberrationsnachweis im Sinne einer Kopienzahlerhöhung oder -minderung sind zudem unterstrichen. Beispielhafte Markierung möglicher Amplifikationen (Pfeil ↗) und Deletionen (Dreieck ▶).

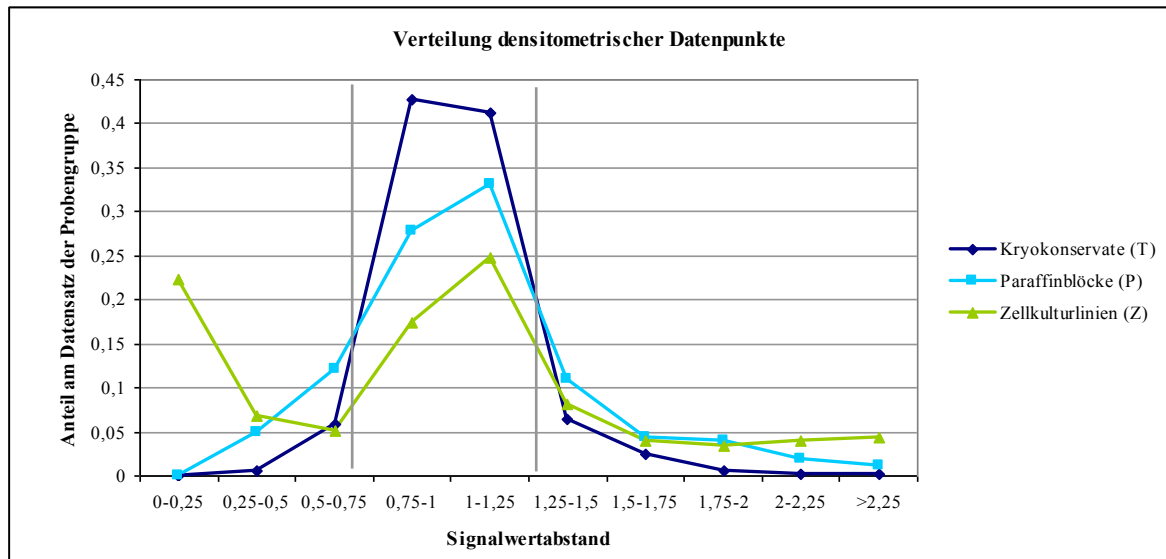


**Abbildung 16:** LICOR-Gelbild der Kryokonservate T21 - T32 zur TSG2-Methylierungsanalyse. Waagerechter Auftrag der einzelnen Tumorproben. Senkrechter Bandenauftrag entsprechend der Basenpaargröße. Referenzbanden sind grau markiert. Die hinsichtlich ihres Methylierungsstatus zu untersuchenden Gene sind fett gedruckt, Genbanden mit Methylierungsnachweis sind zudem unterstrichen. Beispielhafte Markierung möglicher Methylierungen (Rahmen □).

#### 4.4 Auswertung von Kopienzahländerungen

Zur Beurteilung des Kopienzahlstatus standen durch den Einsatz von drei MLPA-Probenkits und der Untersuchung von 77 verschiedenen Genen insgesamt 1847 Datenpunkte einer Auswertung zur Verfügung (pro Probe jeweils 51 Ergebnisse aus TSG-Kits und 26 Werte aus Gain-Kit). Für die Paraffin-eingebetteten Proben P3 - P5 fehlten durch fehlerhaften Gelauftrag 78 Signale aus dem Onkogen-Kit. Die densitometrisch ermittelten Werte fanden sich zum Großteil im numerischen Bereich von  $0,7 < x < 1,3$  wieder (nähere Erläuterungen siehe Kapitel 3.6). Unter Berücksichtigung des divergierenden Umfangs der Probengruppen wurde die Verteilung erhobener Datenpunkte graphisch dargestellt (siehe Abb. 17). Mithilfe der Veranschaulichung konnten bereits erste Aussagen zum Verhalten unterschiedlicher Probenmaterialien hinsichtlich Kopienzahländerungen getroffen werden. Die Analyse der Primärtumore, vor allem der Kryokonservate, zeigten die höchste Verteilung im Normalbereich. In diesem Intervall fanden sich deutlich weniger Datenpunkte, die der Repräsentation der Zellkulturlinien dienten. Im Gegensatz dazu konnten außerhalb des Grenzbereiches vornehmlich Signalwerte der Zelllinien und Paraffinblöcke detektiert werden. Daraus ließ sich vermuten, dass es einen Unterschied zwischen den Probengruppen hinsichtlich ihres Kopienzahlstatus gab. Insbesondere die Zellkulturlinien schienen am wenigsten Normwerte und am meisten Veränderungen entsprechend möglicher Amplifikationen und Deletionen aufzuweisen.

Auch bei Variation des Intervalls blieben die ermittelten Ergebnisverteilungen annähernd gleich. Für eine Vergrößerung des Grenzbereichs ( $0,65 < x < 1,35$ ) wurde der Gesamtanteil an Kopienzahländerungen um 1,7% geringer, da der Normalbereich fiktiv vergrößert wurde. Für eine Verkleinerung des Normalbereichs ( $0,75 < x < 1,25$ ) nahmen die erhobenen Deletionen und Amplifikationen um etwa 2,5% zu. Die daraus errechneten Signifikanzen blieben jedoch annähernd gleich.



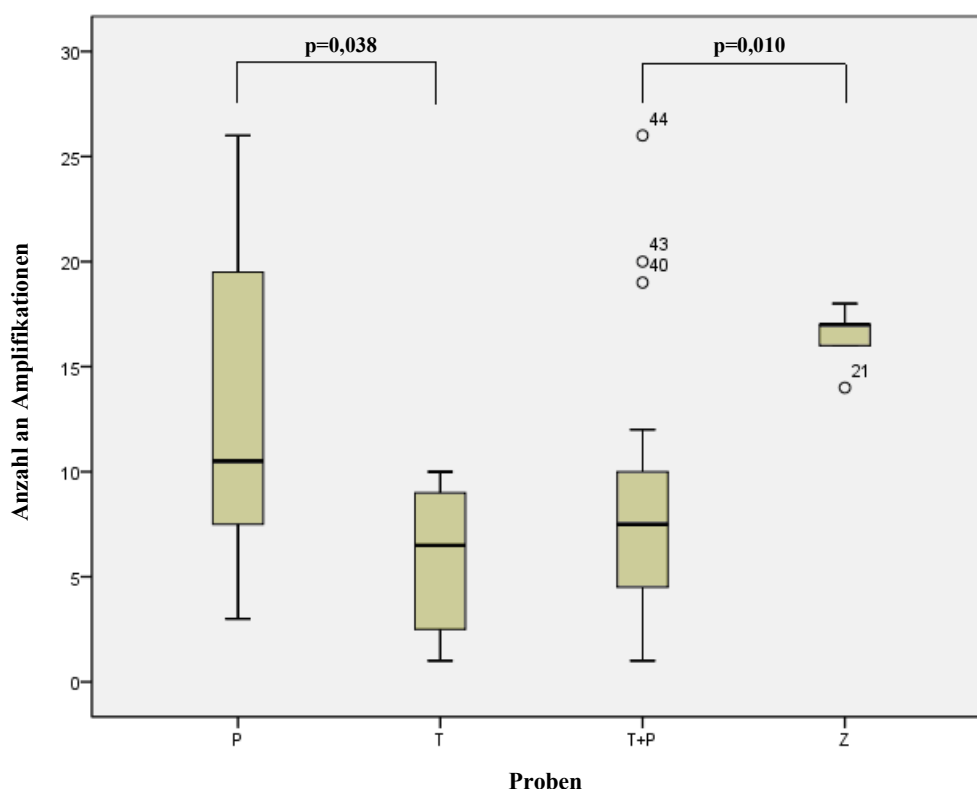
**Abbildung 17:** Verteilung densitometrisch erhobener Datenpunkte  
Separation des unterschiedlichen Probenmaterials entsprechend der Legendenbeschriftung. Abstandseinteilung erhobener Signalwerte auf der x-Achse. Auftrag des Anteils am Datensatz der jeweiligen Probengruppe auf der y-Achse.

#### 4.4.1 Analyse des Amplifikationsstatus

Aus dem Gesamtdatensatz zur Beurteilung des Kopienzahlstatus konnte zunächst ein Amplifikationsanteil von 13,86% (256 von 1847 Datenpunkten) ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass die Tumorsuppressorkits TSG1 und TSG2 den Großteil an Positivergebnissen stellten. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Umfangs der Probengruppen wurde innerhalb dieser der prozentuale Anteil an detektierten Amplifikationen erhoben, welcher sich für die Primärtumore insgesamt auf 11,90% belief (für Paraffinproben 19,33%, für kryokonservierte Exemplare 7,58%). Die Zelllinien zeigten mit einem Wert von 21,30% einen deutlich höheren Anteil. Für eine statistische Einschätzung wurden die Probendaten ausgewertet (siehe Tab. 8) und mittels U-Test auf Signifikanz geprüft. Dieser bestätigte den Unterschied des Amplifikationsstatus von Primärtumoren und Zellkulturlinien als signifikant ( $p=0,010$  einseitig getestet). Jedoch konnte auch innerhalb der Primärtumore zwischen Kryokonservaten und Paraffin-eingebetteten Proben ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p=0,038$  zweiseitig getestet). Die Ergebniskonstellationen wurden mittels Boxplot veranschaulicht (siehe Abb. 18).

**Tabelle 8:** Auswertung der detektierten Amplifikationen

|                             |             | Paraffinblöcke<br>(P) | Kryokonservate<br>(T) | Primärtumore<br>(T+P) | Zellkulturen<br>(Z) |
|-----------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Anzahl der Proben           |             | 8                     | 12                    | 20                    | 5                   |
| Spannweite (Min-Max)        |             | 23 (3-26)             | 9 (1-10)              | 25 (1-26)             | 4 (14-18)           |
| Mittelwert                  |             | 13,00                 | 5,83                  | 8,70                  | 16,40               |
| Standardabweichung          |             | 7,86                  | 3,49                  | 6,54                  | 1,52                |
| 95% Konfidenz-<br>intervall | Untergrenze | 6,43                  | 3,62                  | 5,64                  | 14,52               |
|                             | Obergrenze  | 19,57                 | 8,05                  | 11,76                 | 18,28               |
| Median                      |             | 10,50                 | 6,50                  | 7,50                  | 17,00               |
| 1. Stichprobenquartil       |             | 7,75                  | 3,25                  | 4,75                  | 16,00               |
| 3. Stichprobenquartil       |             | 19,25                 | 8,50                  | 10,00                 | 17,00               |

**Abbildung 18:** Boxplot zur Veranschaulichung detektierter Amplifikationen

Auftrag der jeweiligen Probengruppe auf der x-Achse, Anzahl an Amplifikationen auf der y-Achse. Für alle Tumormaterialien Angaben zum entsprechendem Minimum, Maximum, Ausreißern, Median, 1. und 3. Stichprobenquartil und den ermittelten p-Werten zwischen den Probengruppen.

Innerhalb der verschiedenen Tumorguppen fielen Einzelproben durch ihren besonders hohen Anteil an Amplifikationen auf. Für die Kryokonservate konnten mittels Trendanalyse die Proben T21, T25 sowie T32 (mit jeweils 10 Amplifikationen) vermerkt werden. Bei den Paraffinproben imponierten die Proben P3, P6 und P7 (mit vergleichsweise hohen Werten von 19, 20 und 26). Die Resultate wurden für die spätere

klinische Korrelation festgehalten (siehe Kapitel 4.8). Innerhalb der Zellkulturlinien, welche wie bereits beschrieben deutlich höhere Werte aufzeigten, konnten die Proben Z2, Z3 und Z5 (mit einer Anzahl von 17 bzw. 18) selektiert werden.

Bei der Einschätzung des Amplifikationsstatus einzelner Gene imponierten innerhalb der TSG-Kits die Gene ASC (mit einer Anzahl von 9), CTNN1B und GATA5 (mit einem Wert von 7) sowie RASSF1A, TP73 und TSC2 (mit jeweils 6 Amplifikationen). Für den Gain-Kit P173 konnten die Gene PPM1D sowie FGF4 (mit 6 und 4 Positivergebnissen) notiert werden.

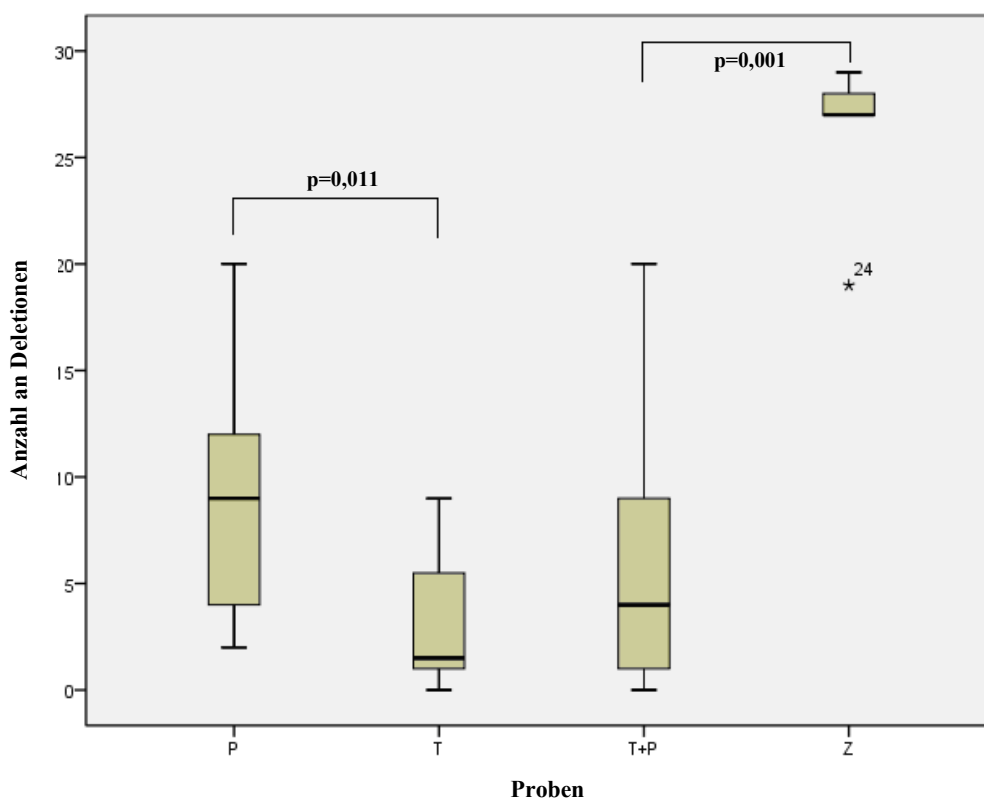
#### 4.4.2 Analyse des Deletionsstatus

Die Auswertung des Datenumfangs zu Kopienzahländerungen ergab einen Deletionsanteil von 12,83% (237 von 1847 Datenpunkten), welcher damit geringgradig unter dem korrespondierenden Wert für die Amplifikationsanalyse lag. Auch hier lieferten die TSG-Kits den überwiegenden Teil an Ergebnissen. Der prozentuale Anteil an Deletionen für die Primärtumore lag bei 7,32% (für Paraffinproben 13,38%, für Kryokonservate 3,79%). Mit einem Wert von 33,77% imponierten erneut die Zellkulturlinien. Der Unterschied zwischen den Probengruppen schien noch deutlicher als der des untersuchten Amplifikationsstatus. Nach Datenauswertung (siehe Tab. 9) wurde auf Signifikanzen geprüft. Es konnte ein relevanter Unterschied zwischen Primärtumoren und Zellkulturlinien in Bezug auf den Deletionsstatus erhoben werden ( $p=0,001$  einseitig getestet). Erneut fand sich aber auch ein statistischer Unterschied zwischen Kryokonservaten und Paraffin-gebetteten Proben ( $p=0,011$  zweiseitig getestet). Die Ergebnisse wurden mittels Boxplot visualisiert (siehe Abb. 19).

Bei der Trendanalyse einzelner Proben mit einem hohen Anteil an Deletionen konnten die Kryokonservate T25, T23 und T32 (mit 9 und jeweils 6 Werten) sowie die Paraffinblöcke P2, P6 und P7 (14, 10 und 20 Deletionen) hervorgehoben werden. Auffallend war eine, dem Amplifikationsstatus ähnliche, Probenkonstellation mit vergleichsweise geringeren Wertmaxima, da die Aberrationsverteilung Unterschiede aufwies. Die Ergebnisse fanden in der klinischen Korrelation Berücksichtigung (siehe Kapitel 4.8). Die Zellkulturlinien wurden erneut durch die Proben Z2, Z3 und Z5 (mit überdurchschnittlich hohen Zahlen von 28, 29 und 27) repräsentiert.

**Tabelle 9:** Auswertung der detektierten Deletionen

|                             |             | Paraffinblöcke<br>(P) | Kryokonservate<br>(T) | Primärtumore<br>(T+P) | Zellkulturen<br>(Z) |
|-----------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Anzahl der Proben           |             | 8                     | 12                    | 20                    | 5                   |
| Spannweite (Min-Max)        |             | 18 (2-20)             | 9 (0-9)               | 20 (0-20)             | 10 (19-29)          |
| Mittelwert                  |             | 9,00                  | 2,92                  | 5,35                  | 26,00               |
| Standardabweichung          |             | 5,93                  | 2,91                  | 5,21                  | 4,00                |
| 95% Konfidenz-<br>intervall | Untergrenze | 4,04                  | 1,07                  | 2,91                  | 21,03               |
|                             | Obergrenze  | 13,96                 | 4,76                  | 7,79                  | 30,97               |
| Median                      |             | 9,00                  | 1,50                  | 4,00                  | 27,00               |
| 1. Stichprobenquartil       |             | 4,00                  | 1,00                  | 1,00                  | 27,00               |
| 3. Stichprobenquartil       |             | 11,00                 | 5,25                  | 9,00                  | 28,00               |

**Abbildung 19:** Boxplot zur Veranschaulichung detektierter Deletionen

Auftrag der jeweiligen Probengruppe auf der x-Achse, Anzahl an Deletionen auf der y-Achse. Für alle Tumormaterialien Angaben zum entsprechendem Minimum, Maximum, Ausreißern, Median, 1. und 3. Stichprobenquartil und den ermittelten p-Werten zwischen den Probengruppen.

Die Deletionsanalyse der Tumorsuppressorkits ergab sowohl für die Gene MSH6 und RASSF1A (mit einer Anzahl von jeweils 7) sowie für ASC, TP73 und TSC2 (mit je 6 Deletionen) erhöhte Werte. Für den Onkogen-Kit P173 konnten die Gene FGF4, SERPINB9 sowie IGFBP5 (mit 5 Deletionen pro Gen) vermerkt werden. Die Beobachtungen ähnelten damit erneut den Ergebnissen zum Amplifikationsstatus.



#### 4.4.3 Kopienzahländerungen in der Übersicht

Alle erfassten Änderungen im Kopienzahlstatus wurden in Tabelle 10 (Teil 1 bis 3) der nachfolgenden Seiten festgehalten. Die Aberrationen wurden farblich verschieden dargestellt (Amplifikationen grün unterlegt, Deletionen orange gekennzeichnet). Fehlende Werte entsprechend eines mangelhaften Gelauftrags wurden grau schraffiert. Die Übersichten zeigten deutlich, dass vor allem die Zellkulturlinien reich an Amplifikationen und Deletionen waren, die Kryokonservate im Gegensatz dazu wenige Änderungen des Kopienstatus aufwiesen.

**Tabelle 10:** Übersicht aller erfassten Kopienzahländerungen untersuchter Medulloblastomproben (Teil 1)

| Gen      | Locus  | Paraffinblöcke |    |    |    |    |    |    |    | Kryokonservierungen |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Zellkulturlinien |    |    |    |    |
|----------|--------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|----|----|----|----|
|          |        | P1             | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | T21                 | T22 | T23 | T24 | T25 | T26 | T27 | T28 | T29 | T30 | T31 | T32 | Z1               | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 |
| NRAS     | 1p13.2 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TP73     | 1p36   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| NTRK1    | 1q23.1 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PIK3C2B  | 1q32   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MSH6     | 2p16   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BCL2L11  | 2q13   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ERBB4    | 2q33   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CASP8    | 2q33.2 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IGFBP2   | 2q35   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IGFBP5   | 2q35   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| FHIT     | 3p14.2 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| RASSF1A  | 3p21.3 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CTNNB1   | 3p21.3 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MLH1     | 3p22   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| RARB     | 3p24   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| VHL      | 3p25.3 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CASR     | 3q21   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PIK3CA   | 3q26.3 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PDGFRA   | 4q11   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IL2      | 4q26   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| APC      | 5q22   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| NFKBIE   | 6p21.1 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TNXB     | 6p21.3 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ESR1     | 6q25.1 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| SERPINB9 | 6p25.2 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PARK2    | 6q26   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |

Deletion

Amplifikation

keine Aussage möglich

**Tabelle 10:** Übersicht aller erfassten Kopienzahländerungen untersuchter Medulloblastomproben (Teil 2)

| Gen      | Locus    | Paraffinblöcke |    |    |    |    |    |    |    | Kryokonservierungen |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Zellkulturlinien |    |    |    |    |
|----------|----------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|----|----|----|----|
|          |          | P1             | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | T21                 | T22 | T23 | T24 | T25 | T26 | T27 | T28 | T29 | T30 | T31 | T32 | Z1               | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 |
| CDK6     | 7q21.3   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BRAF     | 7q34     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PAX5A    | 9p13     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDKN2A   | 9p21     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDKN2B   | 9p21     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| JAK2     | 9p24     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| NTRK2    | 9q21.33  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| DAPK1    | 9q22     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PTCH     | 9q22.3   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CREM     | 10p12.1  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| AI651963 | 10p14    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PTEN     | 10q23.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MGMT     | 10q26    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CD44     | 11p12    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| WT1      | 11p13    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| GSTP1    | 11q13    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| FGF4     | 11q13    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IGSF4    | 11q23    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ATM      | 11q23    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDKN1B   | 12p13.2  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TNFRSF1A | 12p13.31 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TNFRSF7  | 12p13.31 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CYP27B1  | 12q13.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PAH      | 12q23    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CHFR     | 12q24.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BRCA2    | 13q12.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |

Deletion

Amplifikation

keine Aussage möglich

**Tabelle 10:** Übersicht aller erfassten Kopienzahländerungen untersuchter Medulloblastomproben (Teil 3)

|          |          | Paraffinblöcke |    |    |    |    |    |    |    | Kryokonservierungen |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Zellkulturlinien |    |    |    |    |
|----------|----------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|----|----|----|----|
| Gen      | Locus    | P1             | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | T21                 | T22 | T23 | T24 | T25 | T26 | T27 | T28 | T29 | T30 | T31 | T32 | Z1               | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 |
| RB1      | 13q14.2  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IRS2     | 13q34    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MLH3     | 14q24.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| THBS1    | 15q15    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| NTRK3    | 15q25.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IGF1R    | 15q26    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ASC      | 16p12    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TSC2     | 16p13.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDH1     | 16q22.1  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDH13    | 16q23.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TOM1L2   | 17p11.2  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PMP22    | 17p12    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TP53     | 17p13.1  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| HIC1     | 17p13.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BRCA1    | 17q21    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IGFBP4   | 17q21.2  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PPM1D    | 17q23.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BIRC5    | 17q25    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| SERPINB2 | 18q21.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BCL2     | 18q21.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| SERPINB7 | 18q21.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| KLK3     | 19q13.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| GATA5    | 20q13.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| RUNX1    | 21q22.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TIMP3    | 22q12.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |

Deletion

 Amplifikation keine Aussage möglich

#### 4.5 Auswertung der Promotormethylierungen

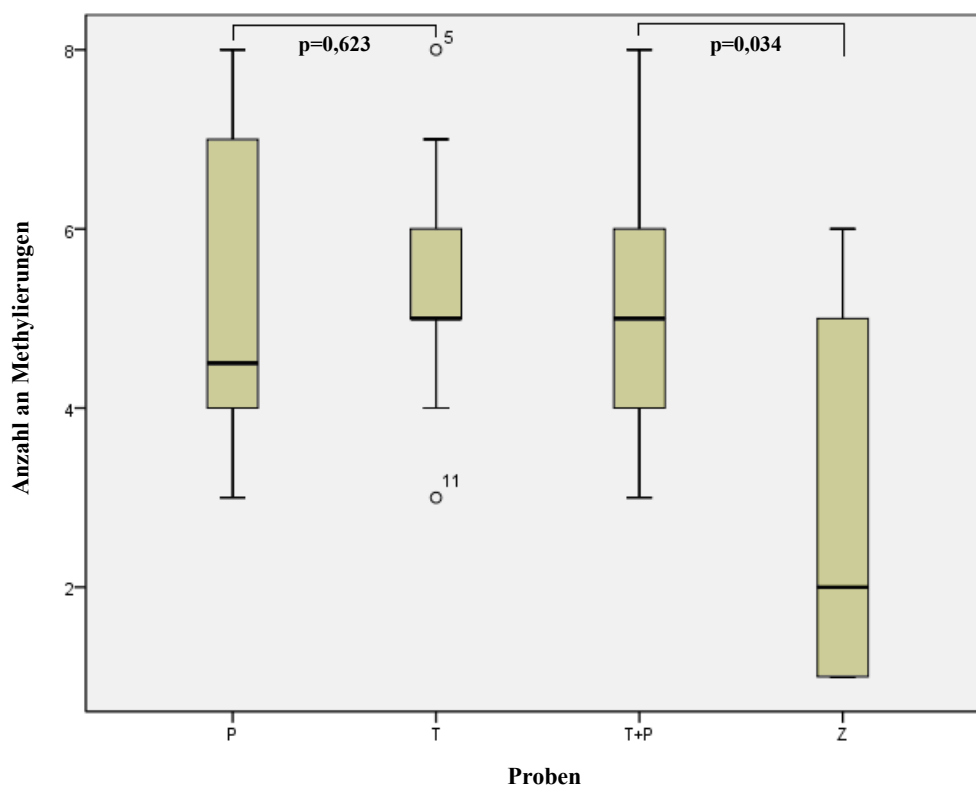
Unter Verwendung der Tumorsuppressorkits TSG1 und TSG2 konnten nach Abzug aller Referenzwerte insgesamt für 33 verschiedene Gene 825 Datenpunkte erhoben werden, die der Beurteilung des Methylierungsstatus dienten. Der überwiegende Teil der Gene (19 von 33 entsprechend 57,58%) wurde anhand der sich ähnelnden TSG-Kits durch zwei oder mehrere Oligonukleotide, die sich gegen unterschiedliche Regionen des Promotors richten können, repräsentiert. Eine Promotorhypermethylierung wurde nur dann als solche datiert, wenn in korrespondierenden Genbanden beider Kits ein Positivergebnis im Gelauftrag vorlag. Für den Versuch einer Wertung bei bereits einem zusätzlichen Bandenauftrag lag der Anteil an detektierten Methylierungen bei 36,24%, was oberhalb eines zu erwartenden Werts lag und auch einer statistischen Betrachtung nicht standhielt.

##### 4.5.1 Analyse des Methylierungsstatus

Aus dem dazugehörigen Datensatz konnte im ersten Schritt ein Methylierungsanteil von 14,79% (122 von 825 Datenpunkten) errechnet werden. Dem Auswertungsschema folgend, wurde auch hier der prozentuale Anteil der verschiedenen Probengruppen an detektierten Promotormethylierungen erhoben, welcher für die Primärtumore insgesamt einen Wert von 16,21% annahm (Paraffinproben 15,91%, Kryokonservierungen 16,41%). Die Zellkulturlinien waren mit einem Anteil von 9,09% im Gegensatz zum Kopienzahlstatus deutlich unterrepräsentiert. Der Datenauswertung folgten eine statistische Untersuchung mittels U-Test sowie die Darstellung mittels Boxplot. (siehe Tab. 11 und Abb. 20)

**Tabelle 11:** Auswertung der detektierten Promotormethylierungen

|                             |             | <b>Paraffinblöcke<br/>(P)</b> | <b>Kryokonservate<br/>(T)</b> | <b>Primärtumore<br/>(T+P)</b> | <b>Zellkulturen<br/>(Z)</b> |
|-----------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Anzahl der Proben           |             | 8                             | 12                            | 20                            | 5                           |
| Spannweite (Min-Max)        |             | 5 (3-8)                       | 5 (3-8)                       | 5 (3-8)                       | 5 (1-6)                     |
| Mittelwert                  |             | 5,25                          | 5,42                          | 5,35                          | 3,00                        |
| Standardabweichung          |             | 1,91                          | 1,31                          | 1,53                          | 2,35                        |
| 95% Konfidenz-<br>intervall | Untergrenze | 3,65                          | 4,58                          | 4,63                          | 0,09                        |
|                             | Obergrenze  | 6,85                          | 6,25                          | 6,07                          | 5,91                        |
| Median                      |             | 4,50                          | 5,00                          | 5,00                          | 2,00                        |
| 1. Stichprobenquartil       |             | 4,00                          | 5,00                          | 4,00                          | 1,00                        |
| 3. Stichprobenquartil       |             | 6,50                          | 6,00                          | 6,00                          | 5,00                        |



**Abbildung 20:** Boxplot zur Veranschaulichung detektierter Methylierungen

Auftrag der jeweiligen Probengruppe auf der x-Achse, Anzahl an Methylierungen auf der y-Achse. Für alle Tumormaterialien Angaben zum entsprechenden Minimum, Maximum, Ausreißern, Median, 1. und 3. Stichprobenquartil und den ermittelten p-Werten zwischen den Probengruppen.

Erneut konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Primärtumoren und Zellkulturlinien ermittelt werden ( $p=0,034$  einseitig getestet), wobei die Ergebniskonstellation nunmehr die Primärtumore, vor allem die kryokonservierten Exemplare, als dominierende Probengruppe herausstellte. Zwischen Kryokonservaten und Paraffin-eingebetteten Proben ließ sich statistisch kein Unterschied herausarbeiten ( $p=0,623$  zweiseitig getestet), was der Intention der Untersuchungen gerecht wurde.

Der Methylierungsanteil der Einzelproben zeigte für die Gruppe der Kryokonservate ein Maximum von 8 für die Probe T25 sowie 7 Positivergebnisse für Probe T32. Innerhalb der Paraffinproben bestachen die Proben P3 und P7 (mit je 8 Methylierungen). Die Ergebnisse wurden in der klinischen Korrelation berücksichtigt (siehe Kapitel 4.8). Für die Zellkulturlinien, welche mit ihrem Anteil an Methylierungen unter den Primärtumoren lagen, konnten die Proben Z1 und Z5 (mit einer Anzahl von 5 und 6) notiert werden. Die Konstellation der Einzelproben zeigte auch hier Parallelen zum Kopienzahlstatus.

Bei der Betrachtung der Methylierungsverteilung innerhalb der Tumorsuppressorgene beeindruckten einige Gene durch ihre extrem hohen Werte im Vergleich zum übrigen Probenumfang, allen voran das Tumorsuppressorgen MSH6 (mit 18 Methylierungen). Auch die Gene CASP8, PAX5A sowie MGMT (mit einer Anzahl von jeweils 15) und TP53 (mit 14 Positivergebnissen) imponierten in der Trendanalyse. Mit einem prozentualen Anteil von 61,11% (77 von 122 detektierten Methylierungen) beeinflussten diese fünf Gene zum überwiegenden Teil die Ergebnisbildung.

#### 4.5.2 Methylierungen in der Übersicht

Die Resultate der durchgeführten Methylierungsanalyse wurden in Tabelle 12 veranschaulicht. Ein Positivergebnis entsprechend einer Promotormethylierung wurde blau gekennzeichnet. Die Grafik verdeutlicht, dass die Zellkulturreihen den geringsten Anteil an Methylierungen boten, die Kryokonservate im Gegensatz dazu die meisten Positivergebnisse lieferten.

Tabelle 12: Übersicht aller erfassten Methylierungen untersuchter Medulloblastomproben

|         |          | Paraffinblöcke |    |    |    |    |    |    |    | Kryokonservierungen |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Zellkulturlinien |    |    |    |    |
|---------|----------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|----|----|----|----|
| Gen     | Locus    | P1             | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | T21                 | T22 | T23 | T24 | T25 | T26 | T27 | T28 | T29 | T30 | T31 | T32 | Z1               | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 |
| TP73    | 1p36.32  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MSH6    | 2p16     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CASP8   | 2q33.2   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| FHIT    | 3p14.2   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| RASSF1A | 3p21.3   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MLH1    | 3p22.1   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| RARB    | 3p24.2   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| VHL     | 3p25.3   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| APC     | 5q22     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ESR1    | 6q25.1   |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PAX5A   | 9p13     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDKN2A  | 9p21     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDKN2B  | 9p21     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| DAPK1   | 9q22     |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| PTEN    | 10q23.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| MGMT    | 10q26    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CD44    | 11p12    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| WT1     | 11p13    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| GSTP1   | 11q13    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| IGSF4   | 11q23    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ATM     | 11q23    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDKN1B  | 12p13.2  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CHFR    | 12q24.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BRCA2   | 13q12.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| RB1     | 13q14.2  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| THBS1   | 15q15    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| ASC     | 16p12    |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| CDH13   | 16q23.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TP53    | 17p13.1  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| HIC1    | 17p13.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| BRCA1   | 17q21.31 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| GATA5   | 20q13.33 |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |
| TIMP3   | 22q12.3  |                |    |    |    |    |    |    |    |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |    |    |    |    |

 Methylierung



#### 4.6 Genaberrationen in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Die Analyse von Genaberrationen der verschiedenen Probengruppen sollte Unterschiede zwischen Primärtumoren und humanen Medulloblastomzelllinien herausstellen. Innerhalb der Primärproben sollten Gemeinsamkeiten im Mutationsverhalten aufgezeigt werden.

Die Zellkulturlinien konnten mit insgesamt 227 Aberrationen (einem theoretischen Durchschnitt von 45 Mutationen pro Probe entsprechend) als mutationsreichste Probengruppe eruiert werden. Sie zeigten im Vergleich zu den Primärtumoren deutlich mehr Amplifikationen (Median 17,0) und Deletionen (Median 27,0), jedoch nur etwa halb so viel Methylierungen (Median 2,0). Diese Unterschiede wurden als statistisch signifikant herausgearbeitet.

Innerhalb der Primärtumore konnten für die Paraffinproben 218 Mutationen (mit einem fiktiven Mittelwert von 27) bestimmt werden. Die Kryokonservate stellten mit einer Anzahl von 170 (und einer theoretischen Verteilung von 14 Mutationen pro Probe) die mutationsärmste Gruppe. Die Primärtumore zeigten wesentlich weniger Änderungen im Kopienzahlstatus. Die kryokonservierten Exemplare boten nur minimale Veränderungen (Amplifikationen mit einem Median von 6,5 sowie Deletionen mit einem Median von 1,5), die Paraffin-eingebetteten Proben präsentierten einen höheren Wert an Amplifikationen (Median 17,0) und Deletionen (Median 9,0). Daraus ergab sich entgegen der Erwartungen ein signifikanter Unterschied innerhalb der Primärtumore. Die Methylierungsanalyse ergab für Paraffinproben und Kryokonservate statistisch gestützte Gemeinsamkeiten. Hier dominierten die kryokonservierten Exemplare (Median 5,0) gegenüber den Paraffinblöcken (Median 4,5) das Mutationsverhalten.

Bezüglich des gesamten Aberrationsstatus aller zu untersuchender Tumormaterialien konnte ein divergierendes Verhalten beobachtet werden. Je reicher eine Probengruppe an Kopienzahlveränderungen war, desto weniger Methylierungen konnten detektiert werden.

#### 4.7 Häufig involvierte Gene

Für die Bewertung von Aberrationen einzelner Gene wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs auf Signifikanzprüfung verzichtet und eine Trendanalyse durchgeführt. Bei der Beleuchtung von Kopienzahlveränderungen konnte herausgearbeitet werden, dass Einzelgene zumeist Abweichungen sowohl im Amplifikations- als auch im Deletionsstatus aufzeigten.

Die mittels TSG-Kits häufig detektierten Tumorsuppressorgene *ASC*, *GATA5*, *RASSF1A*,

TP73 und TSC2 zeigten auffälliger Weise in allen Proben der Zellkulturlinien Deletionen. Das Gen ASC, welches in die zelluläre Apoptosevermittlung eingebunden ist, schien am mutationsreichsten (mit 15 Kopienzahlveränderungen), obwohl es nur mit dem TSG2-Kit untersucht wurde. Dabei fielen vor allem Amplifikationen des genomischen Materials der Primärtumore ins Gewicht. Das RASSF1A-Gen, das in Mechanismen der DNA-Reparatur eingreift, wurde zweimal mittels TSG1-Kit untersucht. Die detektierten Aberrationen (7 Deletionen und 6 Amplifikationen) konnten zum überwiegenden Teil in der Gruppe der Paraffinproben erhoben werden. Die Tumorsuppressorgene TP73 und TSC2, die neben der DNA-Reparatur auch der Wachstumsregulation dienen, wurden durch beide TSG-Kits untersucht. Auch hier erschienen bei jeweils 12 Aberrationen pro Gen (mit 6 Amplifikationen und 6 Deletionen) die Paraffinblöcke äußerst mutationsreich.

Mithilfe des Onkogenkits P173 konnten Gene der Wachstumsregulation als aberrationsreich gekennzeichnet werden, wie beispielsweise das FGF4-Gen mit 9 Mutationen. Hinsichtlich des Verteilungsmusters bot sich hierbei ein anderes Bild. Die Paraffinproben zeigten gehäuft Deletionen, wohingegen die Zellkulturlinien reich an Amplifikationen waren. Auch das Gen IGFBP5 konnte mit 8 Aberrationen, darunter überwiegend Deletionen, vermerkt werden.

Bei der Analyse von Promotormethylierungen imponierten vornehmlich Tumorsuppressorgene, die in DNA-Reparaturmechanismen eingebunden sind. Dazu gehörte MSH6, welches mit 18 von 25 möglichen Methylierungen (entsprechend dem Gesamtprobenumfang) den Maximalwert lieferte. Auch das MGMT-Gen konnte mit 15 Positivergebnissen, die ausschließlich in der Gruppe der Primärtumore zu finden waren, datiert werden. Das Tumorsuppressorgen TP53, das hinsichtlich seiner zellulären Funktion auch in die Gruppe der Reparaturgene einzuordnen ist, zeigte ein anderes Methylierungsverhalten. Neben den gesamten Paraffinproben erschienen auch alle Proben der Zellkulturlinien methyliert. Die Gene CASP8 und PAX5A, in Mechanismen der Apoptoseinduktion und Zellabwehr involviert, wurden durch 15 Methylierungen repräsentiert, welche zum überwiegenden Teil in der Gruppe der Primärtumore, besonders der Kryokonservate, zu finden waren.

#### 4.8 *Korrelation des Genstatus zum klinischem Bild*

Zur Beurteilung eines Zusammenhangs zwischen genetischen Aberrationen und klinischem Status wurden die Proben der Primärtumore näher untersucht. Die Ergebnisse der Aberrationsanalyse wurden mit Patientendaten korreliert. Bewertung fanden dabei Alter

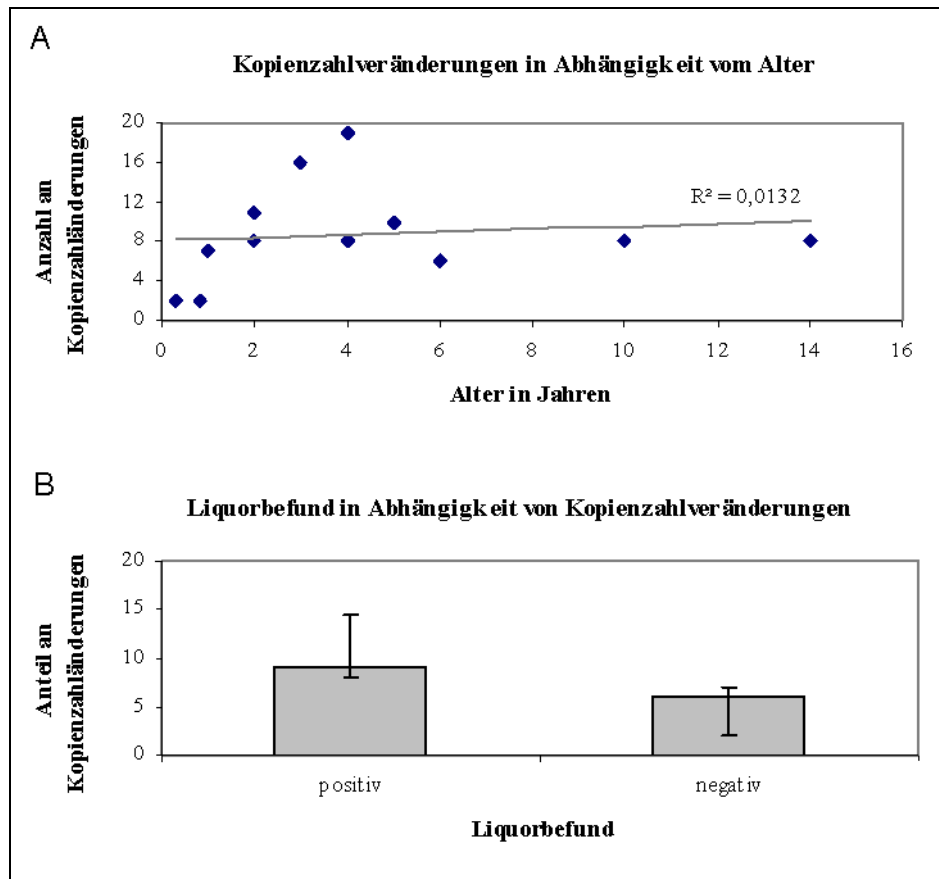
bei Diagnosestellung, Geschlecht sowie Entstehung von Rezidiven. Des Weiteren wurden diagnostische Parameter wie Liquorbefund, histologische Zeichen von Nekrosen und Apoptosen sowie der immunhistochemische Nachweis von GFAP und NSE berücksichtigt.

#### 4.8.1 Einfluss von Kopienzahländerungen

Für die Korrelation des Kopienzahlstatus zur Klinik wurden die Ergebnisse der Kryokonservate (Probenumfang von 12 Exemplaren) verwendet.

Die Darstellung von Kopienzahlveränderungen in Abhängigkeit vom Patientenalter wurde mittels Punktdiagramm realisiert (siehe Abb. 21A). Aufgrund einer möglichen Wertverfälschung durch ein hohes Patientenalter wurden 4 Probenpaare (P1, P4 - P6) ausgeschlossen. Die Altersspanne der berücksichtigten Proben lag bei 0,3 bis 14 Jahren mit einer erkennbaren Datenhäufung bis zum 6. Lebensjahr. Es konnten 2 - 19 Kopienzahlveränderungen datiert werden, wobei die Maximalwerte im Intervall von 2 bis 4 Jahren zu finden waren. Die Analogwerte wurden um eine lineare Trendlinie mit dazugehörigem Bestimmtheitsmaß ergänzt. Dieser Korrelationskoeffizient mit  $R^2=0,0132$  konnte einer statistischen Betrachtung nicht Stand halten, sodass kein signifikanter Zusammenhang zwischen Patientenalter und Kopienzahlstatus erhoben werden konnte. Dennoch konnte festgehalten werden, dass mit zunehmendem Alter eine Konstanz in der (geminderten) Anzahl von Kopienzahlveränderungen vorlag.

Die Veranschaulichung des Zusammenhangs von Kopienzahlveränderungen und einem Tumorzellnachweis im Liquor erfolgte mittels Säulendiagramm (siehe Abb. 21B). Ein Positiv- oder Negativbefund wurde als digitaler Wert mit den anteiligen Kopienzahländerungen der jeweiligen Ergebnisgruppe assoziiert. Es konnten 6 Positivbefunde sowie 5 Negativresultate in die Auswertung einfließen. Trotz kleinem Stichprobenumfang wurden die Analogdaten unter Anwendung des U-Tests auf Signifikanz geprüft ( $p=0,055$  zweiseitig getestet). Dadurch konnte gezeigt werden, dass ein positiver Liquorbefund mit einem erhöhten Anteil an Kopienzahländerungen vergesellschaftet war.



**Abbildung 21:** Klinische Korrelation von Kopienzahländerungen

(A) Kopienzahlveränderungen in Abhängigkeit vom Alter. Auftrag des Patientenalters auf der x-Achse, Anzahl an Kopienzahländerungen auf der y-Achse. Darstellung zusammengehöriger Datenpaare sowie Eintrag einer Trendlinie mit dazugehörigem Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ). (B) Liquorbefund in Abhängigkeit von Kopienzahlveränderungen. Auftrag des Liquorergebnisses auf der x-Achse, Anteil an Kopienzahländerungen auf der y-Achse. Darstellung des 1. und 3. Stichprobenquartils sowie des Medians an der Säulenobergrenze.

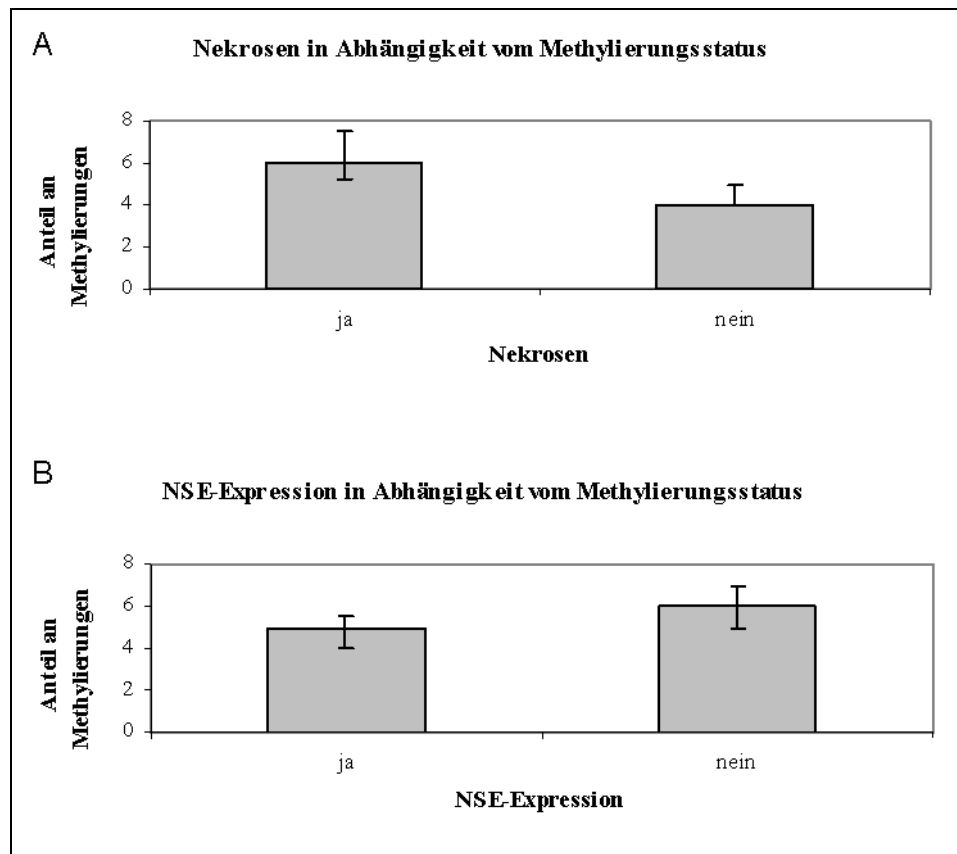
#### 4.8.2 Einfluss von Promotormethylierungen

Für die Untersuchung einer klinischen Korrelation zum Methylierungsstatus wurde der Gesamtumfang an Primärproben (entsprechend 20 Proben) verwendet.

Die Darstellung einer Korrelation zwischen Methylierungsstatus und histologischem Nachweis von Nekrosen erfolgte mittels Säulendiagramm (siehe Abb. 22A). Die Untersuchung ergab sowohl 10 Positiv- als auch Negativergebnisse, sodass die Stichprobengruppen gleich groß waren. Die Prüfung der Analogwerte mittels Mann-Whitney-Test zeigte, dass ein hoher Anteil an Promotormethylierungen signifikant mit einem positiven Nachweis von Nekrosen assoziiert war ( $p=0,004$  zweiseitig getestet).

Auch die Untersuchung der NSE-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus ergab relevante Ergebnisse. In 9 von 20 Fällen bot die immunhistochemische NSE-Prüfung

ein Negativresultat, in 11 Proben konnte die Expression nachgewiesen werden. Unter Verwendung des U-Tests wurde ein statistischer Trend bezüglich des negativen Einflusses von Promotormethylierungen auf eine NSE-Expression errechnet ( $p=0,095$  zweiseitig getestet). Mithilfe eines Säulendiagramms wurde die Ergebniskonstellation visualisiert (siehe Abb. 22B).



**Abbildung 22:** Klinische Korrelation zum Methylierungsstatus

(A) Nekrosen in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. Auftrag des histologischen Ergebnisses auf der x-Achse, Anteil an Methylierungen auf der y-Achse. Darstellung des 1. und 3. Stichprobenquartils sowie des Medians an der Säulenobergrenze. (B) NSE-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. Auftrag des immunhistochemischen Befunds auf der x-Achse, Anteil an Methylierungen auf der y-Achse. Darstellung des 1. und 3. Stichprobenquartils sowie des Medians an der Säulenobergrenze.

#### 4.8.3 Einfluss einzelner Genaberrationen

Zur Untersuchung des Einfluss aberrationsreicher Gene auf die klinische Ausprägung von Medulloblastomen wurde der gesamte Umfang an Primärproben (entsprechend 20 Proben) verwendet. Die erhobenen Digitaldaten wurden als Analogwerte in Verhältnistafeln gegenübergestellt. Kopienzahländerungen wurden nach Amplifikationen und Deletionen separiert. Genamplifikationen wurden dem Zahlenwert 1 zugeordnet, deletierte Gene

wurden mit -1 vermerkt. Signalwerte im Normbereich wurden unter dem Wert 0 eingeordnet. Dem gegenüber stand das klinische Merkmal, beispielsweise die Ausbildung von Apoptosen oder Rezidiventstehung, als dichotome Ja-Nein-Entscheidung mit dem Wert 1 bzw. 0 (siehe Tab. 13). Die statistische Bewertung erfolgte mittels Exaktem Fischer-Test für kleine Stichprobenumfänge (siehe Kapitel 3.7).

**Tabelle 13:** Kopienzahländerungen in der Verhältnistafel

|                 | <b>norm (0)</b> | <b>Amplifikation (1)</b> | <b>Deletionen (-1)</b> |       |
|-----------------|-----------------|--------------------------|------------------------|-------|
| <b>nein (0)</b> | a               | b                        | c                      | a+b+c |
| <b>ja (1)</b>   | d               | e                        | f                      | d+e+f |
|                 | a+d             | b+e                      | c+f                    | n     |

Die Untersuchung des Amplifikationsstatus ergab für einige häufig involvierte Gene (siehe Kapitel 4.7) statistisch aussagekräftige Resultate, welche in Tabelle 14 zusammengefasst wurden. Für das Deletionsverhalten konnten keine relevanten Ergebniskonstellationen herausgearbeitet werden.

Das mittels P173 Gain-Kit analysierte Onkogen PPM1D, das mit einer Anzahl von 6 als amplifikationsreich galt, zeigte im Mutationsverhalten Einfluss auf immunhistochemische Korrelate. Es ergab sich ein Trend zu verstärkter NSE-Expression sowie verminderter GFAP-Ausprägung beim Vorliegen von Genamplifikationen.

Für die Tumorsuppressorgene ASC und GATA5 konnte mit signifikanten Werten demonstriert werden, dass ein positives Amplifikationsergebnis mit einem Apoptosenachweis assoziiert war ( $p=0,019$  sowie  $p=0,029$  zweiseitig getestet, keine Darstellung von GATA5 in Tab. 16). Zudem erwies sich letzteres als Einflussfaktor für eine Rezidivausbildung. Für den Nachweis von Genamplifikationen konnte ein gehäuftes Wiederkehren des Tumorleidens verzeichnet werden, das statistische Relevanz zeigte ( $p=0,038$  zweiseitig getestet). Das Tumorsuppressorgen MSH6, für das 5 Amplifikationen erhoben werden konnten, zeigte ebenfalls eine statistisch bedeutsame Korrelation zwischen Kopienzahlerhöhungen und Apoptosevorgängen ( $p=0,029$  zweiseitig getestet). Auch das RASSF1A-Gen veranschaulichte diesen Zusammenhang zwischen Genstatus und histopathologischem Befund.

**Tabelle 14 :** Einfluss von Kopienzahländerungen auf klinische Parameter

| PPM1D   |    |   |    |    | PPM1D     |    |   |    |    | ASC       |    |   |    |    |
|---------|----|---|----|----|-----------|----|---|----|----|-----------|----|---|----|----|
| NSE     | 0  | 1 | -1 |    | GFAP      | 0  | 1 | -1 |    | Apoptosen | 0  | 1 | -1 |    |
| 0       | 7  | 1 | 0  | 8  | 0         | 1  | 3 | 0  | 4  | 0         | 8  | 2 | 0  | 10 |
| 1       | 4  | 5 | 0  | 9  | 1         | 10 | 3 | 0  | 13 | 1         | 2  | 7 | 1  | 10 |
|         | 11 | 6 | 0  | 17 |           | 11 | 6 | 0  | 17 |           | 10 | 9 | 1  | 20 |
| p=0,088 |    |   |    |    | p=0,092   |    |   |    |    | p=0,019   |    |   |    |    |
| GATA5   |    |   |    |    | MSH6      |    |   |    |    | RASSF1A   |    |   |    |    |
| Rezidiv | 0  | 1 | -1 |    | Apoptosen | 0  | 1 | -1 |    | Apoptosen | 0  | 1 | -1 |    |
| 0       | 11 | 3 | 0  | 14 | 0         | 8  | 0 | 2  | 10 | 0         | 8  | 1 | 1  | 10 |
| 1       | 1  | 4 | 0  | 5  | 1         | 5  | 5 | 0  | 10 | 1         | 4  | 5 | 1  | 10 |
|         | 12 | 7 | 0  | 19 |           | 13 | 5 | 2  | 20 |           | 12 | 6 | 2  | 20 |
| p=0,038 |    |   |    |    | p=0,029   |    |   |    |    | p=0,066   |    |   |    |    |

Der Methylierungsstatus wurde mithilfe einer Vierfeldertafel mit dem klinischen Korrelat verglichen. Methylierten Genen wurde der Zahlenwert 1 zugesprochen. Für fehlende Promotormethylierungen wurde der Wert 0 vergeben (siehe Tab. 15).

**Tabelle 15:** Promotormethylierungen in der Vierfeldertafel

|          | nicht methyliert (0) | methyliert (1) |     |
|----------|----------------------|----------------|-----|
| nein (0) | a                    | b              | a+b |
| ja(1)    | c                    | d              | c+d |
|          | a+c                  | b+d            | n   |

Die Betrachtung verstärkt methylierter Tumorsuppressorgene (siehe auch Kapitel 4.7) ergab für einige klinische Parameter statistisch relevante Ergebnisse, welche in Tabelle 16 veranschaulicht wurden.

Die Untersuchung von CASP8 ergab einen Einfluss von Methylierungen auf einen überwiegend milderen klinischen Verlauf. Ein positives Methylierungsverhalten war mit einer statistisch signifikant geringeren Rezidivausbildung assoziiert ( $p=0,036$  zweiseitig getestet). Für das MGMT-Gen ergab sich ein Trend zwischen Promotormethylierungen und negativem Liquorbefund. Umgekehrt konnte für einen positiven Tumorzellnachweis im Punktat meist ein negatives Methylierungsergebnis eruiert werden. Epigenetische Veränderungen des TSGs MSH6 konnten mit einem geminderten immunhistochemischen NSE-Nachweis assoziiert werden. Für Methylierungen des TP53-Gens konnte eine

Tendenz zum Wiederauftreten des Tumorleidens verzeichnet werden, was einen negativen Einfluss auf den klinischen Verlauf verdeutlicht.

**Tabelle 16:** Einfluss von Promotormethylierungen auf klinische Parameter

| CASP8   |   |    |    | MGMT    |   |    |    | MSH6    |   |    |    | TP53     |    |   |    |
|---------|---|----|----|---------|---|----|----|---------|---|----|----|----------|----|---|----|
| Rezidiv | 0 | 1  |    | Liquor  | 0 | 1  |    | NSE     | 0 | 1  |    | Rezidiv  | 0  | 1 |    |
| 0       | 1 | 13 | 14 | 0       | 0 | 7  | 7  | 0       | 0 | 9  | 9  | 0        | 10 | 4 | 14 |
| 1       | 3 | 2  | 5  | 1       | 5 | 6  | 11 | 1       | 4 | 7  | 11 | 1        | 1  | 4 | 5  |
|         | 4 | 15 | 19 |         | 5 | 13 | 18 |         | 4 | 16 | 20 |          | 11 | 8 | 19 |
| p=0,036 |   |    |    | p=0,054 |   |    |    | p=0,068 |   |    |    | p= 0,071 |    |   |    |

#### 4.8.4 Untersuchung von Einzelproben

Die Beurteilung der klinischen Darstellung von Einzelproben stützte sich auf die genetische Analyse der Tumormaterialien (Vergleich Kapitel 4.4.1, 4.4.2 sowie 4.5.1). Hierbei wurden vornehmlich bekannte Probenkonstellationen mit Aberrationsreichtum beleuchtet und Trendentwicklungen untersucht. Für die Paraffinprobe P3, welche gehäuft Amplifikationen und Promotormethylierungen zeigte, konnte ein schwerer klinischer Verlauf mit Ausbildung einer Meningeosis carcinomatosa und letalem Ausgang erhoben werden. Auch die Tumorprobe P6 mit erhöhten Kopienzahlveränderungen neigte zur Rezidiventstehung. Dem widersprach die klinische Korrelation zu Probe P7. Trotz einer hohen Anzahl an Mutationen wurde über einen Zeitraum von 1 Jahr kein Tumorprogress beobachtet. Es konnte kein allgemein gültiger Zusammenhang zwischen Genaberrationen und klinischem Verlauf ermittelt werden.

Die Kryokonservate T25 und T32 zeigten schwerste genetische Abweichungen im Kopienzahl- und Methylierungsstatus. Als klinische Korrelate konnten Patientenalter und Tumorzellnachweis im Liquor gewertet werden. Während T25 jedoch histologisch nachgewiesene Zellnekrosen und eine Rezidiventstehung verzeichnete, bot T32 einen milderen Verlauf mit Regress des Zellnachweises im Liquorbefund unter adjuvanter Therapie ohne Rezidivausbildung im Beobachtungsintervall. Bei ähnlichem Genstatus konnten folglich Unterschiede in wesentlichen klinischen Punkten vermerkt werden.

Klare genetische Unterschiede bei ähnlicher Klinik boten die Proben P8 und T30. In beiden Fällen waren Patientinnen betroffen und histopathologisch Tumornekrosen befundet wurden. In den Liquorpunktaten wurden keine Tumorzellen nachgewiesen und die Erkrankten profitierten von den eingeleiteten Therapiemaßnahmen. Es konnte ein



prognostisch günstiger Verlauf festgehalten werden. Jedoch zeigte die Paraffinprobe P8 (mit 27 detektierten Aberrationen) mehr als doppelt so viele Mutationen als das Kryokonservat T30 (mit 11 Aberrationen).

Einen Gegensatz dazu stellten die Kryokonservierungen T24 und T28 dar. Trotz unauffälligem Aberrationsverhalten wurde ein schwerer klinischer Verlauf mit frühzeitiger Rezidiventstehung und letalem Ausgang innerhalb weniger Jahre nach Erstdiagnose erhoben.

In der Auswahl desmoplastischer Medulloblastomproben imponierten P2 und T32 durch zahlreiche Mutationen, klinisch boten sie wenige Besonderheiten. Auch die übrigen Vertreter dieser histologisch determinierten Gruppe (T22, T26, T29, T31) blieben unauffällig.

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass einige diagnostische Parameter, beispielsweise der Liquorbefund, in statistischer Korrelation zum genetischen Status standen. Innerhalb der Einzelproben ließen sich verschiedenste Variationen einer klinischen Ausprägung erheben. Daraus konnten jedoch keine Allgemeingültigkeiten postuliert werden. Auch eine histologische Differenzierung der Tumorproben in klassische Medulloblastome und desmoplastische Formen ergab keine Trendentwicklung für eine klinische Korrelation.

## 5 Diskussion

### *5.1 Einordnung des Studiendesigns*

In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Aberrationen von Medulloblastomzellen mithilfe des MLPA- beziehungsweise MS-MLPA-Verfahrens erfasst und analysiert. Hierfür konnten insgesamt 25 Medulloblastomproben, darunter 8 Paraffin-eingebettete Proben, 12 Kryokonservate sowie 5 DNA-Aufarbeitungen aus Medulloblastom-Zellkulturlinien, akquiriert werden. Unter Verwendung dreier Probenkits der Firma MRC Holland wurden 77 verschiedene Gene auf Kopienzahlveränderungen sowie 33 unterschiedliche Tumorsuppressorgene auf Promotorhypermethylierungen untersucht. Die eingesetzten vorgefertigten Kits enthielten MLPA-Sonden mit einer Auswahl an häufig mutierten Genen verschiedener Tumorentitäten. Da die Anwendung und Methodik der PCR-Untersuchung im Vordergrund der Betrachtung stand und weniger die Frage nach spezifischen genetischen oder epigenetischen Veränderungen in Medulloblastomzellen, wurde auf die Verwendung eines individuellen Probenkits verzichtet.

Das MLPA-Verfahren wurde 2002 erstmals von Schouten *et al.* vorgestellt [Schouten *et al.* 2002]. Bereits ein Jahr später fand die PCR-Methode in der Forschungsarbeit zu Mamma- und Ovarialkarzinomen Anwendung [Montagna *et al.* 2003]. Im Jahr 2005 wurde die erste neuroonkologische Untersuchung mittels MLPA durchgeführt. Hierbei wurden neunzehn Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Proben von Oligodendrogliomen auf chromosomale Deletionen untersucht und die Resultate mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bewertet. In 18 von 19 Fällen waren die Ergebnisse der PCR-Methode konkordant zu denen der Standardmethode [Natté *et al.* 2005]. Durch die zeitgleiche Etablierung der MS-MLPA konnte nun auch das Methylierungsverhalten von Genen analysiert werden [Nygren *et al.* 2005]. Jeuken *et al.* stellten MLPA-Untersuchungen an Gliomen an (mit Probenumfängen von 88 und 62 Tumoren) und gebrauchten dafür sowohl Paraffinblöcke als auch kryokonservierte Exemplare [Jeuken *et al.* 2006, Jeuken *et al.* 2007]. Auch in der Erforschung subtelomerer Chromosomenveränderungen bei genetisch bedingten Erkrankungen, wie mentaler Retardierung oder angeborenen Missbildungen, wurde das Verfahren eingesetzt [Ahn *et al.* 2007]. In der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Jena wurden 2008 MS-MLPA-Analysen an insgesamt 29 Hirntumoren, darunter Meningeome, Gliome und intrakranielle Metastasen, durchgeführt und damit die Grundlage weiterer

Forschungsarbeit auf diesem Gebiet geschaffen [Ewald *et al.* 2008, Hoffmann 2008]. Die Anwendung der MLPA zur genetischen Untersuchung von Medulloblastomen findet bisher nur einmal in der Literatur Erwähnung. Hierbei wurde, im Rahmen der Untersuchung von 36 Paraffin-gebetteten Tumorproben auf Mikrosatelliteninstabilitäten, eine erste Analyse zu Hypermethylierungen von Tumorsuppressorgen mithilfe des ME011-Probenkits durchgeführt [Viana-Pereira *et al.* 2009]. Die Verifizierung der MLPA-Methode durch Alternativverfahren wie FISH, CGH oder MS-PCR (Methylierungsspezifische PCR) ist Bestandteil heutiger wissenschaftlicher Bestrebungen [Natté *et al.* 2005, van Dijk *et al.* 2005, Ahn *et al.* 2007, Jeuken *et al.* 2007, Combaret *et al.* 2012, Véronèse *et al.* 2013]. Beispielsweise konnte die Prüfung des MLPA-Verfahrens mittels vergleichender genomischer Hybridisierung an Paraffin-eingebetteten Melanomproben eine Ergebnisübereinstimmung von 86% zeigen [van Dijk *et al.* 2005]. Eine aktuelle Vergleichsuntersuchung an 91 kryokonservierten Neuroblastomproben berichtet von einer 82%igen Konkordanz [Combaret *et al.* 2012]. Die angestellten Vergleichsuntersuchungen mit Standardverfahren unterstreichen in der Mehrheit der Fälle die Validität der MLPA-Methode [Natté *et al.* 2005, van Dijk *et al.* 2005, Ahn *et al.* 2007, Jeuken *et al.* 2007, Véronèse *et al.* 2013].

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Kopienzahlveränderungen und Promotorhypermethylierungen von Medulloblastomen mittels MLPA-Analyse beleuchtet. Unter Verwendung dreier Probenkits wurden dabei Primärtumore mit humanen Medulloblastomzelllinien hinsichtlich ihrer Genaberrationen verglichen. Auch die diesbezügliche Untersuchung und Bewertung unterschiedlicher Probenmaterialien ist neuartig. Neben der Detektion genetischer Aberrationen wurden häufig involvierte Gene herausgearbeitet und die gewonnenen Ergebnisse mit bisherigen Forschungsergebnissen verglichen. Zur Abschätzung einer prognostischen Relevanz erfolgte zudem eine umfangreiche Korrelation des Genstatus zum klinischen Erscheinungsbild. Der relativ geringe Probenumfang von insgesamt 25 Exemplaren ist aufgrund der niedrigen Tumorzinzidenz und dem gestellten Ziel einer Anwendungsprüfung der PCR-Methode vertretbar.

Methodisch divergierende Studien zu genetischen Aberrationen von Medulloblastomen weisen Stichprobenumfänge von 5 bis 212 Tumoren auf [Yoshimoto *et al.* 2006, Northcott *et al.* 2009]. Diese bedienten sich neben klassischen Verfahren wie der Histologie, Immunhistochemie und Karyotypisierung auch molekularbiologischen Standardmethoden wie FISH, CGH sowie moderner Microarray- und PCR-

Untersuchungen (Vergleiche Kapitel 1.6.1) [Bayani *et al.* 2000, Rood *et al.* 2004, Mendrzyk *et al.* 2005, Yoshimoto *et al.* 2006, Faoro *et al.* 2011, Northcott *et al.* 2011]. Es wurde mit verschiedenen Probenmaterialien, wie Zellkulturlinien oder tierischen und humanen Primärtumoren in Form von Paraffin-eingebetteten Proben und Kryokonservaten gearbeitet [Lee *et al.* 2003, Mendrzyk *et al.* 2005, Yoshimoto *et al.* 2006, Faoro *et al.* 2011]. Lindsey *et al.* stellten 2004 zudem einen Vergleich von Zellkulturlinien und Paraffinproben an [Lindsey *et al.* 2004].

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse über genetische Veränderungen von Medulloblastomen lassen sich größtenteils mit den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbaren (siehe Kapitel 1.2). Zum einen konnten tumorspezifische Mutationen der Chromosomen 10 und 17 nachgewiesen werden, zum anderen wurden charakteristische Kopienzahlerhöhungen der Onkogene CTNNB1 und PPM1D bestätigt [Bayani *et al.* 2000, Mendrzyk *et al.* 2005, Clifford *et al.* 2006, Castellino *et al.* 2008, Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Auch tumorspezifische Promotorhypermethylierungen der Tumorsuppressorgene RASSF1A und CASP8 konnten ermittelt werden [Lusher *et al.* 2002, Lindsey *et al.* 2004, Ebinger *et al.* 2006, Chang und Ng 2007]. Zugleich entsprach der erhobene Methylierungsstatus des Reparaturgens MGMT der Literaturmeinung [Rood *et al.* 2004, Faoro *et al.* 2011]. Einige bereits bekannte Chromosomenmutationen (Chromosom 1 und 5 betreffend) und Genveränderungen, beispielsweise die Amplifikation der Onkogene PDGFR oder CDK6, konnten jedoch nicht nachgewiesen werden [Mendrzyk *et al.* 2005, Northcott *et al.* 2011]. Andere genetische Aberrationen wurden aufgrund der Verwendung von unspezifischen Probenkits nicht untersucht. Dazu zählen die Onkogene ERBB2, GLI1 oder OTX2 sowie das Protoonkogen MYC und die Tumorsuppressorgene PTCH sowie EHMT1.

Bezüglich der erhobenen Untersuchungsergebnisse konnten zum überwiegenden Teil bekannte Aberrationen bestätigt werden, was die Validität des MLPA-Verfahrens unterstreicht. Gleichzeitig wurden neue, interessante Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene vermerkt.

## 5.2 *Evaluierung angewandter Methoden*

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit angewandten Methoden kritisch beurteilt werden. Zunächst wurde ein nahezu vollständiger Datensatz an klinischen Informationen erhoben (siehe Kapitel 3.1 sowie 3.2). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass einige Kriterien, beispielweise histologische Befunde, der Subjektivität des Untersuchers unterliegen und

ein Vergleich dieser daher hinterfragt werden sollte. Die Anfertigung histologischer Schnittbilder sowie die DNA-Aufreinigung der Tumorproben erfolgten nach vorgefertigten Protokollen (vergleiche Abschnitt 3.3). Die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeitsschritte konnte durch Konzentrationsbestimmung des isolierten DNA-Materials sowie dessen gelelektrophoretische Darstellung unterstrichen werden (siehe Kapitel 4.2). Die photometrisch erhobenen Ausgangskonzentrationen der DNA-Proben zeigten starke Wertschwankungen, welche vermutlich auf die angewandten Konservierungsverfahren und die Lagerung der Proben zurückzuführen sind (vergleiche Kapitel 5.4). Die Agarose-Gelelektrophoresen wiesen leichte Helligkeitsschwankungen der korrespondierenden Gelabschnitte auf. Diese begründen sich wahrscheinlich auf den unterschiedlichen DNA-Gehalt des jeweiligen Auftrags (2 µl DNA im unteren Abschnitt im Gegensatz zu einem DNA-Gehalt von 5 µl im oberen Bildteil).

Das im Anschluss daran durchgeführte MLPA-Verfahren wird in einem eigenen Abschnitt bewertet (siehe Kapitel 3.4 sowie 5.3). Einer Verfälschung der PCR-Ergebnisse durch nicht-tumoröse Zellen, zum Beispiel Stroma- oder Blutzellen, wurde durch Probendisektion der Paraffinblöcke entsprechend der histologischen Bewertung entgegengewirkt, auch wenn dies laut Herstellerangaben nicht notwendig gewesen wäre (siehe Abschnitt 5.3.1) [Schouten *et al.* 2002]. Die Verwendung eines unzureichenden Gehalts an genetischem Material konnte bereits durch quantitative und qualitative Beurteilung der DNA-Proben ausgeschlossen werden (vergleiche Kapitel 4.2). Trotz der Simultanuntersuchung verschiedener DNA-Sequenzen durch die MLPA verlangte die Visualisierung der PCR-Produkte mittels LICOR-Gelelektrophorese mehrere Aufträge (siehe Kapitel 4.3). Ein Vergleich dieser ist durch die immer neu geschaffenen experimentellen Rahmenbedingungen nur eingeschränkt gegeben. Durch Kontrollfragmente im Gelauftrag konnte der Erfolg der Amplifizierung bestätigt werden. Die Beurteilung der Gelbilder wurde jedoch möglicherweise durch eine Verfälschung der Bandenintensitäten beeinflusst. Unterschiedliche Signalstärken der PCR-Produkte entstehen unter anderem durch die Menge der verwendeten Polymerase. Zudem besteht eine Abhängigkeit von der Eigenschaft des ersten Nukleotids, das im Auftrag auf den Primer folgt [Schouten *et al.* 2002]. Innerhalb der LICOR-Bilder traten vereinzelt zusätzliche Signale mit verminderter Intensität auf, welche als Artefakte zu werten sind. Ursächlich hierfür könnte ein fehlerhafter Probenauftrag oder die Verwendung eines älteren Elektrophoresegels sein. Auch signalstarke Banden, eventuell durch Überlagerungen von Probenmaterialien entstanden, können zu Fehlinterpretationen führen.

Für die Auswertung der densitometrisch erhobener Daten ergeben sich weitere Kritikpunkte (siehe hierzu Abschnitt 3.6). Trotz Normalisierung der Signalwerte unter Einbeziehung der Mediane kann nicht verhindert werden, dass Signalabnormalitäten die Bewertung benachbarter Bandenintensitäten verfälschen oder zusätzliche Kopienzahlveränderungen der Gesamtdaten einer DNA-Sequenz die Analyse beeinflussen [Ahn *et al.* 2007, Hoffmann 2008]. Obgleich Herstellerempfehlungen für die Zuordnung von Amplifikationen und Deletionen existieren, bieten diese Grenzwerte die Möglichkeit fehlerhafter Schlussfolgerungen [Schouten *et al.* 2002]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei Variation der Intervallgrenzen die ermittelten Ergebnisverteilungen und ihre zugehörigen Signifikanzen annähernd gleich blieben (siehe Kapitel 4.4). Die genetische Untersuchung von Tumorgewebe bietet häufig den Nachteil fehlender Bezugspunkte. Da für die vorliegende Arbeit, nicht zuletzt aus ethischen Gründen, kein gesundes menschliches Hirngewebe als Referenzprobe zur Verfügung stand, musste auf einen entsprechenden Vergleich verzichtet werden.

Der Methylierungsstatus konnte ohne densitometrische Analyse anhand zusätzlicher Banden abgelesen werden, unterlag dabei jedoch der subjektiven Beurteilung. Für den überwiegenden Teil der Gene konnten durch die Verwendung zweier TSG-Kits mit divergierenden Bindungssequenzen unterschiedliche Regionen der Promotoren untersucht werden. Für diese mehrfach repräsentierten Tumorsuppressorgene kam es nur bei positivem Methylierungsnachweis in beiden Kits zu einem Vermerk. Daraus ergab sich ein Selektionsvorteil für TSGs, die nur in einer Untersuchung betrachtet wurden. Anhand eines einzelnen Methylierungsnachweis kann jedoch nicht direkt auf einen heterozygoten Funktionsverlust eines Gens geschlossen werden. Hingegen ist die Detektion von zwei Methylierungen mithilfe von zwei verschiedenen MLPA-Proben, welche an unterschiedlichen Cytosin-Guanin-Sequenzen desselben Promotors binden, ein deutlicherer Hinweis für einen möglichen heterozygoten Funktionsverlust des Gens [Hoffmann 2008]. Ergebnisse, die auf der Verwendung zweier Probenkits basieren, werden dadurch in ihrer Glaubhaftigkeit gestärkt [Schouten *et al.* 2008]. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte dies exemplarisch für die TSGs RASSF1A sowie MGMT gezeigt werden. Jedoch traten auch divergierende Analyseergebnisse auf (beispielsweise für die Gene ESR1, PTEN und RB1).

Weiterhin sollte die statistische Bewertung der Analyseergebnisse hinterfragt werden (Erläuterung siehe Kapitel 3.7). Der angewandte U-Test verliert an Schärfe und Validität, wenn die Umfänge der Stichproben zu stark voneinander divergieren und sollte nicht

verwendet werden, wenn die Verteilungsunterschiede innerhalb der Probenpopulationen unterschiedlich groß sind. Für kleinere Stichproben unterliegen die Ergebnisse einer stärkeren Streuung, sodass das Testverfahren an Sensitivität verliert [Bortz und Lienert 2008]. Die in dieser Arbeit vertretenen statistischen Tests wurden, auch in Anbetracht der vorliegenden Stichprobenumfänge (12 Kryokonservate, 8 Paraffinproben sowie 5 Zellkulturlinien), von Dr. rer. nat. M. Walther (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena) auf deren Eignung und Richtigkeit geprüft.

Für die Korrelation des Kopienzahlstatus zur Klinik wurden die Ergebnisse der Kryokonservate (12 Proben) verarbeitet (siehe Kapitel 4.8.1). Die Prüfung der Probenqualitäten hatte valide Ergebnisse für diese Population versprochen (vergleiche Kapitel 4.2 sowie 5.4). Die entsprechenden Resultate der Paraffin-eingebetteten Proben wurden zum einen aufgrund der Tumorqualität (siehe Kapitel 4.2 sowie 5.4), zum anderen wegen eines unvollständigen Datensatzes nicht einbezogen. Eine Korrelation zum Methylierungsstatus dieser Proben war dennoch möglich (siehe Kapitel 4.8.2), da für die Detektion von Promotorhypermethylierungen kein hochmolekulares genomisches Material benötigt wird [Nygren *et al.* 2005] (vergleiche Abschnitt 5.3.1). Die Analyse von Promotormethylierungen beleuchtet chemische Modifikationen des Erbmaterials auf epigenetischer Ebene und nicht Veränderungen der DNA-Sequenz, welche durch genotoxische Mechanismen beeinflusst werden können. Durch einen größeren Probenumfang (20 Primärtumore) konnte die Aussagekraft der statistischen Analysen gesteigert werden. Für die Betrachtung eines möglichen klinischen Bezugs von Aberrationen einzelner Gene wurden erneut alle Primärtumorproben, sowohl für den Kopienzahl- als auch den Methylierungsstatus, eingeschlossen. So konnte der Einfluss von Kopienzahlveränderungen auf detektierbare Promotormethylierungen von TSGs berücksichtigt und statistische Ergebnisse gefestigt werden.

### 5.3 *Möglichkeiten und Grenzen des MLPA-Verfahrens*

#### 5.3.1 Vorteile der Untersuchungsmethode

Die MLPA bzw. MS-MLPA stellt ein PCR-Verfahren dar, mit dem im Multiplexansatz sowohl der Kopienzahl- als auch der Promotormethylierungsstatus von Probenmaterialien untersucht werden kann [Nygren *et al.* 2005]. Die simultane Untersuchung von bis zu 45 verschiedenen DNA-Sequenzen ermöglicht identische experimentelle

Rahmenbedingungen [Schouten *et al.* 2008]. Im Vergleich zu alternativen Nachweismethoden zeichnet sich die Untersuchungsmethode durch eine einfache, schnelle und reproduzierbare Anwendung aus. Sie ist ein relativ kostengünstiges Verfahren, welches zudem durch einen minimalen Probenverbrauch besticht. Für die Untersuchung werden pro Versuchsanordnung und Tumorprobe nur 20 ng DNS benötigt, was je nach Gewebeart einer Probenmenge zwischen 10 und 25 mg entspricht [Schouten *et al.* 2002, Schouten *et al.* 2008]. Für den Nachweis genetischer und epigenetischer Veränderungen solider Tumore ist dabei lediglich ein Anteil von 50% Tumor-DNA notwendig, sodass eine direkte Untersuchung des heterogenen Tumorgewebes möglich ist [Jeuken *et al.* 2006, Schouten *et al.* 2008]. Dadurch kann auf eine mitunter schwierige Zellpräparation oder Anzucht von Tumor-Zelllinien verzichtet werden. Als Probenmaterialien eignen sich neben Frischpräparaten auch Kryokonservate und Paraffinblöcke [Natté *et al.* 2005, Nygren *et al.* 2005, van Dijk *et al.* 2005, Jeuken *et al.* 2006, Jeuken *et al.* 2007]. Degradierungen kleinerer DNA-Fragmente beeinflussen das Ergebnis des PCR-Verfahrens nicht wesentlich [Schouten *et al.* 2002, van Dijk *et al.* 2005]. Eine DNA-Fragmentierung stellt vor allem für die MS-MLPA kein Hindernis dar, da für Hybridisierung und Ligation eine Fragmentlänge von 50 - 60 bp ausreichend ist. Für die Digestion mittels Restriktionsendonuklease wird keine doppelsträngige DNA benötigt, sodass die Denaturierung des genomischen Materials den PCR-Vorgang nicht einschränkt [Nygren *et al.* 2005].

Innerhalb der Untersuchungsmethode werden hoch spezifische Probe-Mixes eingesetzt. Die geringe Größe der verwendeten Oligonukleotide ermöglicht die Mutationsanalyse einzelner Nukleotide sowie Exons benachbarter Zielsequenzen, wodurch eine hohe Sensitivität erreicht wird [Schouten *et al.* 2002]. Herstellerempfehlungen ermöglichen eine standardisierte Durchführung, Auswertung und Interpretation der MLPA, sodass potentielle Fehlerquellen beim Laborieren und Analysieren minimiert werden können.

### 5.3.2 Nachteile der Untersuchungsmethode

Das MLPA-Verfahren ermöglicht die Untersuchung einer bestimmten Anzahl bereits bekannter DNA-Abschnitte, die durch den Besatz des Probenkits definiert werden. Für eine Genom-weite Untersuchung ohne konkrete Fragestellung ist das Verfahren jedoch ungeeignet. Die PCR-Reaktion ist relativ empfindlich gegenüber Verunreinigungen, beispielweise durch Phenolreste, welche zur Reduktion der Signalstärke führen können [Schouten *et al.* 2008]. Zudem beeinflussen die Menge der verwendeten Polymerase und



die Nukleotideigenschaften der Amplifizierungsprodukte die Signalintensitäten (siehe Kapitel 5.2) [Schouten *et al.* 2002]. Die genetische Analyse von Tumorproben mit weniger als 50% Tumor-DNA kann durch nicht-tumoröse Zellen verfälscht werden. MLPA-Experimente an heterogenen Proben erheben die durchschnittliche Anzahl an Kopienzahlveränderungen [Schouten *et al.* 2008].

Genetische Aberrationen des zu untersuchenden Materials, welche die phänotypische Expressionsvielfalt ausmachen und keinen Krankheitswert besitzen, können die Untersuchungsergebnisse falsch-positiv beeinflussen [Sebat *et al.* 2004, Wong *et al.* 2007]. Genpolymorphismen in der Nähe von Ligationsstellen können zur Signalreduktion führen [Ahn *et al.* 2007, Schouten *et al.* 2008]. Darüber hinaus ist das PCR-Verfahren für die Detektion kleinster Genveränderungen wie Punktmutationen ungeeignet [Schouten *et al.* 2008, Véronèse *et al.* 2013]. Daneben weist auch die Untersuchung des Methylierungsstatus potentielle Fehler auf. So können fälschlicherweise Hypermethylierungen von CpG-Inseln, die nicht in der Promotorregion von Genen liegen und damit keine transkriptionelle Regulation übernehmen, detektiert werden [Jones and Baylin 2002]. Andererseits können aufgrund der Bindungsspezifität der Restriktionsendonuklease Promotorhypermethylierungen unentdeckt bleiben [Schouten *et al.* 2008]. Da die MS-MLPA nur individuelle CpG-Regionen untersucht, werden epigenetische Veränderungen anderer Nukleotidsequenzen unterrepräsentiert [Jeuken *et al.* 2007]. Genommutationen innerhalb der HhaI-Erkennungssequenz können den enzymatischen Abbau des zu untersuchenden Probenmaterials und damit die Analyseergebnisse beeinflussen. Eine inkomplette Digestion führt beispielsweise zu verfälschenden Hintergrundsignalen im Gelauftrag [Nygren *et al.* 2005].

Die genannten Schwächen des MLPA-Verfahrens sind sicher auch ursächlich dafür, dass die Untersuchungsmethode bislang nur für Forschungszwecke zugelassen ist [Schouten *et al.* 2008]. Für die klinische Anwendung dürfen die Kosten für einen Versuchsdurchlauf mit nur wenigen Tumorproben und die Folgen falsch-positiver Ergebnisse für eine Therapieentscheidung nicht vernachlässigt werden [Combaret *et al.* 2012].

#### 5.4 Aussagekraft der Probenmaterialien für Genuntersuchungen

Die MLPA-Analysen der unterschiedlichen Probengruppen dienen nicht nur der Erhebung von genetischen Unterschieden zwischen Primärtumoren und Zellkulturlinien humaner Medulloblastome beziehungsweise dem Nachweis gemeinsamer Mutationseigenschaften

von Primärtumoren, sondern auch einem Vergleich der Probenmaterialien hinsichtlich ihrer Aussagekraft für Genuntersuchungen (siehe Kapitel 4.4 bis 4.6).

Es konnten sowohl für den Kopienzahl- als auch für den Methylierungsstatus signifikante Unterschiede zwischen Zellkulturproben und Primärtumoren ermittelt werden.

Die kultivierten Zelllinien zeigten unter allen Probenmaterialien die meisten Kopienzahlveränderungen, wohingegen ihr Methylierungsverhalten am schwächsten ausgeprägt war. Hierbei präsentierten vor allem die Exemplare hohe Raten an Amplifikationen und Deletionen, für die ein undifferenzierter Charakter bekannt war (Z2, Z3 sowie Z5), was die Validität der erhobenen Daten unterstreicht. Zudem versprachen der gelelektrophoretische Nachweis hochmolekularer, undegradierter DNA und die photometrische Ermittlung konstanter Ausgangskonzentrationen des genomischen Materials zuverlässige Analyseergebnisse (siehe Kapitel 4.2). Für die Arbeit mit Zellkulturen in der Tumorgenetik sollte jedoch beachtet werden, dass sich die genetischen Charakteristika von Zellen verändern können, wenn sie über eine längere Zeit kultiviert werden, und damit den Ursprungstumor nicht mehr repräsentieren [Faoro *et al.* 2011]. Betrachtungen von primären Gliomen und selbigen Zelllinien zeigten signifikante Unterschiede der Probengruppen hinsichtlich ihrer genetischer Aberrationen [Hesson *et al.* 2004, Li *et al.* 2008]. Dabei boten die kultivierten Zelllinien einerseits zusätzliche Kopienzahlveränderungen und ähnelten damit den in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturen humaner Medulloblastome [Li *et al.* 2008]. Andererseits konnten Abweichungen im Methylierungsstatus der Probenmaterialien festgehalten werden [Hesson *et al.* 2004]. Damit besteht die Gefahr einer fehlerhaften Interpretation des biologischen Verhaltens von Primärtumoren und falscher Schlussfolgerungen in der präklinischen Phase von Therapiestudien [Li *et al.* 2008]. Demzufolge sollten für molekulargenetische Untersuchungen zur Detektion tumorspezifischer Genveränderungen, auch im Hinblick auf eine Praxisrelevanz, vorrangig Primärtumoren zum Einsatz kommen [Hesson *et al.* 2004].

Bei der Betrachtung von kryokonservierten und Paraffin-eingebetteten Proben ergaben sich bei ähnlichem Methylierungsverhalten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kopienzahlveränderungen der Primärtumore, welche nicht zu erwarten waren.

Die Kryokonservate boten den unauffälligsten Kopienzahlstatus, stellten jedoch die Probengruppe mit der höchsten Anzahl an Promotormethylierungen. Ihr DNA-Material präsentierte sich als qualitativ hochwertig mit Fragmentgrößen von mehr als 10 kb (siehe Kapitel 4.2). Da zugleich keine Anzeichen für Degradierungen der Proben bestanden,

konnte eine fehlerhafte Konservierung oder Lagerung derer ausgeschlossen werden. Bei der Betrachtung von Kopienzahlveränderungen können demzufolge für kryokonservierte Proben mit guter DNA-Qualität valide Ergebnisse angenommen und diese Exemplare als wichtige Vertreter von Primärtumoren hervorgehoben werden. Die Zuverlässigkeit der Kryokonservate beruht auf einer relativ gewebeschonenden Probenfixierung, bei der durch Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff die Qualität und Unversehrtheit des genetischen Materials gewährleistet werden kann. Um Degradierungen der DNA zu vermeiden, sollte jedoch auf eine korrekte Lagerung der Exemplare geachtet werden, da ein ungewolltes Auftauen und erneutes Einfrieren mit Zellstress und -schädigung verbunden sein können [Corthals *and* Desalle 2005].

Die Paraffin-eingebetteten Proben demonstrierten gehäuft Kopienzahlveränderungen mit einer hohen Anzahl von Amplifikationen und Deletionen, ihr Methylierungsstatus nahm eine Zwischenposition im Vergleich zu den anderen Probengruppen ein. Die Abweichungen der Kopienzahlen begründeten sich höchstwahrscheinlich auf der Qualität der Tumorproben (siehe Kapitel 4.2). Die Darstellung ihrer DNA mittels Gelelektrophorese offenbarte überwiegend fragmentiertes und niedermolekulares genetisches Material mit deutlichen Hinweisen für eine Degradierung, auch wenn in dieser Probengruppe die höchsten DNA-Ausgangskonzentrationen gemessen werden konnten und die DNA-Mengen ausreichend waren. Die Defekte des Tumormaterials entstanden vermutlich während der Probenfixierung, wobei die Dauer, Temperatur und Lösung das Konservierungsverfahren beeinflussen können. Die verlängerte Einlagerung in Formaldehydlösung führt zur Zerstörung von Nukleinsäuren und zur Fragmentierung des genomischen Materials [Lehmann *and* Kreipe 2001]. Durch die DNA-Denaturierung kann eine Digestion durch Restriktionsenzyme erschwert werden. Die Lagerungsdauer der Paraffinblöcke (über mehrere Jahre bei Raumtemperatur) sollte ebenfalls berücksichtigt werden [Nygren *et al.* 2005]. Somit kann die Verwendung von Paraffin-eingebetteten Proben für molekulargenetische Untersuchungen durch die Quantität und Qualität ihrer DNA eingeschränkt werden, was die kritische Bewertung gewonnener Ergebnisse implizieren sollte.

Ein bekräftigendes Beispiel bietet der Vergleich von Paraffin-eingebetteten mit kryokonservierten Proben in der genetischen Untersuchung pädiatrischer Hirntumore mittels *real-time* PCR. Dabei zeigten sich die Paraffinproben stärker fragmentiert und wiesen geringere Mengen an genomischen Material auf. Die starke Variabilität der Amplifizierungsergebnisse der fragmentierten DNA der Paraffinblöcke bewies, dass die

Validität entsprechender PCR-Untersuchungen kritisch hinterfragt werden sollte [Ferguson *et al.* 2012].

Im Gegensatz dazu offerierten bisherige Ausführungen, dass DNA-Fragmentierungen und -Denaturierungen keine Einschränkungen für die Analyse von beispielsweise Paraffinproben mittels MLPA bzw. MS-MLPA darstellen (siehe Abschnitt 5.3.1) [Nygren *et al.* 2005]. Jeuken *et al.* konnten durch MLPA-Untersuchungen an Paraffin-eingebetteten und kryokonservierten Proben von Gliomen feststellen, dass sich beide Materialgruppen für das Verfahren eigneten und die Ergebnisse miteinander vergleichbar waren [Jeuken *et al.* 2006, Jeuken *et al.* 2007]. Der Gebrauch der MS-MLPA an Paraffinblöcken und korrespondierenden Kryokonservaten von Tumoren erbrachten sogar identische Ergebnisse [Nygren *et al.* 2005]. Darüber hinaus konnten auch Studien zum Vergleich der MLPA mit Standardmethoden wie CGH und FISH beweisen, dass das PCR-Verfahren erfolgreich an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Proben (mit partiell degradierter DNA) angewandt werden kann [van Dijk *et al.* 2005, Natté *et al.* 2005].

Die Aussagekraft von Paraffinproben für genetische Analysen ist demzufolge stets individuell zu bewerten. Sie sollte in Abhängigkeit der gewählten Untersuchungsmethode beurteilt und anhand der Ergebnisse anderer Probenmaterialien oder Alternativverfahren geprüft werden.

## 5.5 Wertung der Aberrationen in Medulloblastomzellen

### 5.5.1 Kopienzahländerungen

Der Nachweis von Kopienzahlveränderungen konnte sowohl für die untersuchten Onkogene als auch für die analysierten Tumorsuppressorgene erbracht werden. Insgesamt wurden 256 Amplifikationen und 237 Deletionen (bei 1847 Datenpunkten) ermittelt, wobei die Proben der humanen Medulloblastomzelllinien die verhältnismäßig höchsten Werte lieferten (vergleiche Kapitel 4.4.1, 4.4.2 sowie 4.6).

Die klinische Korrelation der detektierten Kopienzahländerungen (siehe Kapitel 4.8.1) in Abhängigkeit vom Patientenalter ergab eine Datenhäufung bis zum 6. Lebensjahr mit Maximalwerten im Intervall von 2 bis 4 Jahren, was geringgradig unter dem vermeintlichen Erkrankungsalter von Medulloblastomen liegt. Auch wenn kein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter bei Diagnosestellung und Kopienzahlstatus erhoben werden konnte, ließ sich dennoch festhalten, dass mit zunehmendem Alter eine konstantere und geringere Anzahl von Kopienzahlveränderungen vorlag. Dies könnte mit

einem milderen Krankheitsverlauf bei höherem Patientenalter in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 1.2) [Clifford *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2012]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein positiver Tumorzellnachweis im Liquor mit einem erhöhten Anteil an Kopienzahländerungen vergesellschaftet war (siehe Kapitel 4.8.1). Damit wird deutlich, dass die Anhäufung genetischer Aberrationen die maligne Progression begünstigen kann [Payne *and* Kemp 2005, Zheng *et al.* 2005].

Die Betrachtung häufig involvierter Gene ergab zumeist Abweichungen sowohl im Amplifikations- als auch im Deletionsstatus. Der gesteigerte Nachweis von Kopienzahlveränderungen könnte als Ausdruck einer hohen genetischen Instabilität und komplexer Mutationsmechanismen angesehen werden, ohne dass die einzelnen Genmutationen einen direkten Einfluss auf das biologische Verhalten des Malignoms besitzen können [Hoffmann 2008]. Ebenso ist zu beachten, dass Variationen von Kopienzahlen Genom-weit vertreten und für die phänotypische Varianz entscheidend sind. Genamplifikationen und -deletionen müssen demnach kein pathologisches Korrelat darstellen und sollten im Kontext zu regulären Kopienzahlvariationen betrachtet werden [Sebat *et al.* 2004, Wong *et al.* 2007].

Einen weiteren Einflussfaktor bietet der Zugewinn oder Verlust größerer Chromosomenabschnitte, der Zielsequenzen mehrere MLPA-Proben umfasst und den Eindruck multipler Aberrationen bzw. einer fortschreitenden Progression der Erkrankung vermittelt [Hoffmann 2008]. Diesbezüglich konnte das Chromosom 17, welches häufig prognostisch relevante Kopienzahlveränderungen in Medulloblastomen aufweist, hervorgehoben werden [Gulino *et al.* 2008, McCabe *et al.* 2011, Northcott *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2012]. Sowohl auf dem kurzen Arm, für den vertretend die Gene PMP22 sowie HIC1 genannt werden können, als auch auf dem langen Arm des Chromosoms, wo sich gehäuft Amplifikationen von BRCA1 und PPM1D fanden, ließen sich gemeinsame Aberrationen bestätigen. Fernerhin konnten für das 10. Chromosom deletierte Abschnitte nachgewiesen werden, die beispielsweise die Gene MGMT und PTEN auf 10q betrafen.

Die Untersuchung des Kopienzahlstatus von Medulloblastomen konnte einige charakteristische Mutationen, beispielsweise die Amplifikation des Onkogens CTNNB1, herausarbeiten. Andere, wie Aberrationen der Gene CDK6 oder PDGFR, konnten wiederum nicht gezeigt werden. Aufgrund der Verwendung unspezifischer Probenkits wurden zudem relevante Onkogene, z.B. ERBB2, GLI1 oder OTX2 nicht repräsentiert.

### 5.5.2 Promotormethylierungen

Die innerhalb dieser Arbeit angestellten Analysen konnten insgesamt 122 (von 825 möglichen) Genmethylierungen detektieren, die vornehmlich in den Reihen der Primärtumore zu finden waren (vergleiche Kapitel 4.5.1 sowie 4.6).

Die klinische Korrelation der erhobenen Promotorhypermethylierungen (siehe Kapitel 4.8.2) mit dem histopathologischen Nachweis von Nekrosen ergab signifikante Werte ( $p=0,004$  zweiseitig getestet). Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die Förderung des Tumorwachstums durch epigenetische Veränderungen, was aufgrund einer vaskulären Mangelversorgung zur Ausbildung von Nekrosearealen führen kann [Giangaspero *et al.* 2007]. Weiterhin konnte ein Trend bezüglich des negativen Einflusses des Methylierungsstatus auf eine NSE-Expression ermittelt werden. Da bei Vorliegen dieser Genaberrationen eher ein gesteigerter Nachweis zu vermuten wären, sollte die Heterogenität des Erscheinungsbildes von Medulloblastomen bedacht werden (siehe Kapitel 1.1.1) [Giangaspero *et al.* 2007].

Tumorsuppressorgene können neben Promotorhypermethylierungen auch Deletionen aufweisen [Tomlinson *et al.* 2002, Sherr 2004, Zheng *et al.* 2005]. Der Einfluss von Kopienzahlveränderungen auf das Ergebnis eines Methylierungsnachweis sollte nicht unberücksichtigt bleiben, da der Verlust von Chromosomenabschnitten auch Promotorregionen einschließen kann und damit einen falsch-negativen Methylierungsstatus bedingen würde. Die in dieser Arbeit erhobenen genetischen und epigenetischen Veränderungen von Tumorsuppressorgenen zeigten einerseits Parallelen in ihrer Verteilung (sowohl Deletionen als auch Methylierungen der Gene PAX5A und MSH6 in Zellkulturproben zu finden). Andererseits konnte ein gegensätzliches Mutationsverhalten gezeigt werden (bei Deletionsnachweis der Gene RASSF1A und MGMT kein Methylierungsnachweis in entsprechenden Proben der Zelllinien).

Aufgrund der Bindungsspezifität der für die MS-MLPA charakteristischen Restriktionsendonuklease konnten nicht bei allen auf Kopienzahlanomalien untersuchten Genen auch epigenetische Veränderungen analysiert werden [Schouten *et al.* 2002]. Beispielsweise war eine Erhebung des Methylierungsstatus für das Tumorsuppressorgen PTCH, das in Medulloblastomen mutiert erscheint, nicht möglich. Für andere TSGs, wie RB1 oder APC, die eine potentielle Rolle für die Genese der pädiatrischen Hirntumore spielen, konnten nur vereinzelte bzw. keine Promotorhypermethylierungen verzeichnet werden.

## 5.6 Betrachtung häufig involvierter Gene

### 5.6.1 Ausgewählte Onkogene

Nähere Erläuterungen der nachstehenden Onkogene hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung sowie Ausführungen zum aktuellen Forschungsstand sind dem Kapitel 1.3.2 zu entnehmen.

#### 5.6.1.1 FGF4

Das *fibroblast growth factor 4* (FGF4)-Gen konnte mit 9 detektierten Aberrationen als mutationsreiches Onkogen vermerkt werden. Die Erhebung von 4 Positivergebnissen für Amplifikationen kann mit Wachstumsprozessen im Rahmen der Karzinogenese vereinbart werden [Ornitz *et al.* 2001, Schouten *et al.* 2008]. Die Tatsache, dass nur die Proben der Zellkulturlinien Kopienzahlerhöhungen zeigten, unterstreicht, dass FGF4 vor allem Reifungsprozesse undifferenzierter Nervenzellen reguliert [Yamamoto *et al.* 2000, Ornitz *et al.* 2001, Duplan *et al.* 2002, Lieu *et al.* 2011]. Eine potentielle Genexpression in Kleinhirnzellen gilt als bekannt. Für eine FGF4-Beteiligung in der Genese von Medulloblastomen spricht weiterhin das Auftreten der Erkrankung im Kindesalter, in dem Nervenzellverbände noch nicht vollends ausgereift sind, da das Onkogen die Entwicklung und Vernetzung neuronaler Strukturen fördert [Yamamoto *et al.* 2000]. Die Ermittlung von 5 Deletionen sollte nicht überbewertet werden, da sie vorwiegend die Paraffinproben betraf (Einschränkungen in der Bewertung entsprechend Kapitel 5.4).

Die Betrachtung anderer Wachstumsgene, welche derselben Genfamilie zugehörig sind, ermöglicht interessante Ableitungen. So konnte für FGF1 und besonders FGF2 eine Schlüsselrolle in der Tumorangiogenese herausgestellt werden, welche mit einer vermeintlichen Resistenz für eine antiangiogenetische Therapie verbunden ist [Lieu *et al.* 2011]. Auch FGF4 zeigt eine positive Wirkung auf das Gefäßwachstum und unterstützt die Ausbildung vaskularisierter Tumore [Yoshida *et al.* 1994]. Damit lassen sich nicht nur Parallelen erkennen, sondern auch Rückschlüsse auf mögliche Therapieeinschränkungen ziehen. Im Gegensatz dazu vermittelt FGF2 neben FGF9 zugleich eine Inhibition der Progression von Medulloblastomzelllinien durch die Induktion der neuronalen Differenzierung, einer Wachstumsverlangsamung und Apoptoseeinleitung, sodass auch für FGF4 antitumorale Eigenschaften denkbar wären [Duplan *et al.* 2002].

Wenngleich bislang keine gesteigerten Kopienzahlen des Wachstumsgens für

Medulloblastome bekannt sind, ist der Einfluss einer FGF4-Mutation auf die Entstehung und Progression der pädiatrischen Hirntumore vorstellbar und sollte, auch in Anbetracht neuer Therapieansätze, Bestandteil weiterführender Untersuchungen sein.

#### 5.6.1.2 IGFBP5

Für das Gen *insulin-like growth factor binding protein 5* (IGFBP5) konnten 8 Aberrationen detektiert werden. Neben der Bedeutung für die neuronale Entwicklung wird IGFBP5 ein proliferativer und antiapoptotischer Effekt zugeschrieben, der zu einem gesteigerten Zellüberleben führt und die Entstehung und Progression von Hirntumoren fördert [Zumkeller 2002, Wang *et al.* 2006, de Bont *et al.* 2008]. Diesbezüglich können die erhobenen Amplifikationen mit der Ausbildung von Medulloblastomen assoziiert sein. Diese These wird bekräftigt durch eine nachgewiesene Überexpression des Bindungsproteins in Ependymomen, welche ein ähnliches Erkrankungsalter und eine benachbarte Tumorlokalisation zeigen [de Bont *et al.* 2008]. Immunhistochemische Untersuchungen von Gliomen konnten bereits eine signifikante Korrelation zwischen IGFBP5-Nachweis und histologischer Graduierung der malignen Tumore aufzeigen, was den Einfluss auf eine anaplastische Progression vermuten lässt [Wang *et al.* 2006]. Da Medulloblastome ebenfalls hochmaligne Neoplasien darstellen, können Kopienzahl-erhöhungen des Onkogens als valide bewertet werden. Die detektierten Deletionen (5 Positivergebnisse) wurden erneut vor allem in den Reihen der Paraffin-eingebetteten Proben erhoben, was ihre Aussagekraft mindert (Erklärung siehe Kapitel 5.4).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine IGFBP5-Überexpression in Brusttumoren mit einem erhöhten invasiven Tumorwachstum, einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegen IGF-Therapieansätze korreliert [Becker *et al.* 2012]. Folglich kann IGFBP5 auch für Medulloblastome als potentieller Tumormarker und Therapiemodulator vermutet werden. Bislang konnten in den pädiatrischen Hirntumoren lediglich signifikante IGFBP2- und IGFBP3-Anstiege ermittelt werden, wobei IGFBP2 als Prädiktor für eine schlechtere Prognose herausgestellt werden konnte [de Bont *et al.* 2008].

Obgleich die Mutation und eine daraus folgende klinische Relevanz von IGFBP5 für Medulloblastome bislang ungeklärt ist, könnten dahingehende Studien für eine Prognoseeinschätzung und Therapieentscheidung bedeutsam sein.



### 5.6.1.3 PPM1D

Das Onkogen *protein phosphatase magnesium-dependent 1δ* (PPM1D), welches indirekt Mechanismen des Zellzyklusarrest und der Apoptose hemmt, zeigte in der MLPA-Analyse die höchste Anzahl an Amplifikationen (mit 6 Positivergebnissen in den Reihen der Primärtumore) [Bulavin *et al.* 2002, Castellino *et al.* 2008]. Eine PPM1D-Überexpression konnte bereits in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden und lässt sich mit der Genese von Medulloblastomen vereinbaren [Bulavin *et al.* 2002, Lambros *et al.* 2010]. Dies kann durch methodisch differente Arbeiten bestätigt werden [Mendrzyk *et al.* 2005, Castellino *et al.* 2008]. Der positive Nachweis von Kopienzahlerhöhungen der Primärtumore gegenüber den Zellkulturlinien deckt sich ebenfalls mit einer Vergleichsuntersuchung von Castellino *et al.* und weist auf die Validität der ermittelten MLPA-Daten hin [Castellino *et al.* 2008].

Die detektierten Amplifikationen des Onkogens konnten mit immunhistochemischen Parametern assoziiert werden. Kopienzahlerhöhungen führten einerseits zu einer verstärkten NSE-Expression, andererseits zu einer verminderten GFAP-Ausprägung. Eine inverse Korrelation zu immunhistologischen Parametern, wie EGFR oder Zytokeratin 5/6, konnte bereits für Mammakarzinome gezeigt werden [Lambros *et al.* 2010]. Ein erhöhter Nachweis der Neuronenspezifischen Enolase kann bei Hirntumoren, wie dem Medulloblastom, verzeichnet werden [Giangaspero *et al.* 2007]. Auch das saure Gliafaserprotein kann in den kindlichen Tumoren nachgewiesen werden [Son *et al.* 2003, Collins 2004, Giangaspero *et al.* 2007]. Der überwiegend von Stützzellen gebildete Marker glialer Tumorformen findet sich in undifferenzierten Zellen klassischer Medulloblastome [Giangaspero *et al.* 2007]. Anaplastische Subtypen zeigen wiederum keine GFAP-Ausprägung [Son *et al.* 2003]. Dies könnte eine mögliche Begründung für den verminderten Nachweis des Proteins sein.

Bislang ließ sich kein Zusammenhang zwischen PPM1D-Aberrationen und dem klinischen Erscheinungsbild von Medulloblastomen feststellen [Mendrzyk *et al.* 2005]. Auch die in dieser Arbeit angestellten Korrelationsanalysen konnten keine Prognoserelevanz herausarbeiten. Eine Überexpression von PPM1D konnte jedoch bereits bei Brustkrebspatienten mit einem verminderten Rezidiv-freien Intervall in Verbindung gebracht werden [Zhang *et al.* 2006].

Die erhobenen Analysedaten sowie die festgestellten diagnostischen Korrelate weisen darauf hin, dass das Onkogen nicht nur für die Entstehung von Medulloblastomen

bedeutsam ist, sondern auch die klinische Ausprägung, Befundung und Prognose der pädiatrischen Tumore beeinflusst. Auch in Anbetracht einer möglichen Therapieresistenz gegenüber genotoxischer Substanzen (siehe Kapitel 1.3.2.3) sollte PPM1D daher zukünftig weiter erforscht werden [Bulavin *et al.* 2002, Castellino *et al.* 2008].

### 5.6.2 Ausgewählte Tumorsuppressorgene

Nähere Erläuterungen der folgenden Tumorsuppressorgene hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung sowie Ausführungen zum aktuellen Forschungsstand sind dem Kapitel 1.4.2 zu entnehmen.

#### 5.6.2.1 ASC

Die MLPA-Analyse des Tumorsuppressorgens ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), welches Mechanismen des programmierten Zelluntergangs reguliert, ergab einen Maximalwert von 15 Kopienzahlveränderungen. Mithilfe des TSG2-Kits konnten 9 Amplifikationen ermittelt werden, von denen nur die Primärtumore betroffen waren (mit 5 Kopienzahlerhöhungen der Kryokonservate und 4 Positivergebnissen für die Paraffinproben). Wenngleich diese Ergebnisse zunächst unverständlich erscheinen, lassen sie sich doch mit einer ASC-Überexpression vereinbaren, welche bereits für Mammakarzinome in Assoziation mit einer Apoptoseeinleitung und Inhibition des Tumorwachstums gebracht werden konnte [Conway *et al.* 2000]. Für Medulloblastome wäre ein günstiger Einfluss von Kopienzahlerhöhungen auf den Krankheitsverlauf denkbar, obgleich diesbezüglich keine klinische Korrelation festgestellt werden konnte. Andererseits ergab sich eine Signifikanz zwischen positivem Amplifikationsergebnis und histologischem Apoptosenachweis ( $p=0,019$  zweiseitig getestet). Damit konnten die Charakteristika des Gens hervorgehoben und die Untersuchungsergebnisse bestätigt werden. Weiterhin wurden 6 Deletionen des Tumorsuppressorgens detektiert, auffälliger Weise in allen Zellkulturlinien, was das unterschiedliche Mutationsverhalten der verschiedenen Probengruppen unterstreicht (Vergleich Kapitel 5.4).

Die Erhebung des Methylierungsstatus ergab lediglich zwei Positivergebnisse der Kryokonservate. Die epigenetische Ausschaltung des ASC-Gens durch aberrante DNA-Methylierung konnte bereits mit der Entstehung diverser Tumore verbunden werden [Conway *et al.* 2000, Stone *et al.* 2004, Riojas *et al.* 2007, Tamandani *et al.* 2009,

Hong *et al.* 2013]. Genetische Untersuchungen von kolorektalen Neoplasien und Glioblastomen konnten eine Korrelation zwischen Promotorhypermethylierungen und fortgeschrittenem Tumorstadium bzw. verkürztem Gesamtüberleben erheben [Stone *et al.* 2004, Riojas *et al.* 2007]. Der Funktionsverlust von TSGs, welcher zu einer verminderten oder fehlenden Proteinexpression führt und die Entwicklung maligner Neoplasien begünstigt, kann jedoch durch verschiedenste Genommutationen, sowohl Deletionen als auch Hypermethylierungen der Promotorregion, ausgelöst werden [Jones and Baylin 2002, Lo *et al.* 2002, Sherr 2004, Stone *et al.* 2004, Luczak and Jagodzinski 2006]. Eine Vielzahl humaner Zellkulturlinien verschiedener Tumore zeigen keine ASC-Expression, was sich mit dem Deletionsnachweis innerhalb der Medulloblastomzelllinien decken könnte [Masumoto *et al.* 1999].

Eine verminderte Repräsentation des Gens wird mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika (Etoposid) in Zusammenhang gebracht werden [Masumoto *et al.* 1999, Hong *et al.* 2013]. Eine Therapie mit demethylierenden Substanzen bzw. Methyltransferase-Inhibitoren (Decitabin) kann trotz epigenetischer Genveränderungen eine erneute Proteinexpression von ASC bewirken [Conway *et al.* 2000, Stone *et al.* 2004, Riojas *et al.* 2007]. Diese verstärkt die apoptotische Wirkung DNA-schädigender Zytostatika (Doxorubicin oder Etoposid). Genamplifikationen, die mit einer ASC-Überexpression verbunden sind, könnten folglich die zytostatische Therapie von Medulloblastomen unterstützen, was den Einfluss auf einen günstigen Tumorverlauf bekräftigt.

Die Genese und Prognose von Medulloblastomzellen wird vermutlich durch multiple ASC-Aberrationen beeinflusst, die bisher nicht im Interesse der Forschung standen, jedoch aufgrund einer eventuellen Therapierelevanz in Zukunft näher analysiert werden sollten.

#### 5.6.2.2 CASP8

Für das Gen CASP8 (*cysteine-aspartic acid protease 8*), dessen zugehöriges Enzym Apoptosevorgänge reguliert, konnten 8 Kopienzahlveränderungen festgehalten werden (7 Amplifikationen und 1 Deletion). Hierbei fielen positive Amplifikationsnachweise in allen Zellkulturproben ins Auge. Weiterhin wurden 15 Methylierungen detektiert, die lediglich die Primärtumore betrafen. Für die DAOY-Ziellinie, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurde (Z1), ist eine hohe CASP8-Expression bekannt, Promotorhypermethylierungen konnten bislang nicht gezeigt werden [Lindsey *et al.* 2004, Meister *et al.* 2007]. Dies bekräftigt die erhobenen genetischen und epigenetischen

Veränderungen und verdeutlicht das unterschiedliche Mutationsverhalten von Zellkulturlinien und Primärtumoren, das in der Datenauswertung berücksichtigt werden sollte (siehe Kapitel 5.4). Die epigenetische Aberration des proapoptotischen Gens führt zur Resistenz gegen Apoptoseprozesse und fördert Tumorentstehung und -progress [Pingoud-Meier *et al.* 2003, Lindsey *et al.* 2004]. Signifikant gesteigerte Promotorhypermethylierungen von CASP8 in Medulloblastomen gelten als tumorspezifisch [Lindsey *et al.* 2004, Ebinger *et al.* 2006]. Auch zerebelläres Gewebe, das als potentieller Ausgangspunkt für die Entstehung der kindlichen Hirntumore gewertet werden kann, zeigt basale Methylierungen des Apoptosegens [Lindsey *et al.* 2004].

Für Glioblastome wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Methylierungsrate und raschem Tumorprogress festgestellt [Martinez *et al.* 2007]. Pingoud-Meier *et al.* konnten aufzeigen, dass die verminderte CASP8-Expression in Medulloblastomen zu einem kürzeren progressionsfreien Intervall und einer reduzierten Gesamtüberlebenszeit führt [Pingoud-Meier *et al.* 2003]. Die in dieser Arbeit angestellten Korrelationsanalysen ergaben allerdings, dass Methylierungen des Tumorsuppressorgens, welche mit einer verminderten Genexpression einhergehen können, die Rezidivausbildung statistisch signifikant verringern und einen milderen klinischen Verlauf bedingen ( $p=0,036$  zweiseitig getestet). Dieses widersprüchliche Ergebnis beruht möglicherweise darauf, dass CASP8 keine typische CpG-Region besitzt, was zum einen die Bedeutung von Promotormethylierungen für die Genausschaltung in Frage stellt, zum anderen die Analyse mittels MS-MLPA verfälschen kann [Banelli *et al.* 2002]. Es wäre denkbar, dass aufgrund der Bindungsspezifität des Restriktionsenzym, das innerhalb des Verfahrens zum Einsatz kommt, fehlerhafter Weise Hypermethylierungen, die nicht in der Promotorregion des Gens lagen, detektiert wurden und/oder andere epigenetische Veränderungen unentdeckt blieben [Jones and Baylin 2002, Schouten *et al.* 2008]. Auch Genommutationen in der Erkennungssequenz der Endonuklease können die Analyseergebnisse beeinflussen (vergleiche Kapitel 5.3.2) [Nygren *et al.* 2005].

Genetische Aberrationen des Tumorsuppressorgens CASP8 stellen bedeutsame Mutationen von Medulloblastomen dar, sodass ausführlichere Untersuchungen vielversprechend sein dürften. Einen entscheidenden Punkt sollte dabei die Resistenz gegen chemo- und radiotherapeutische Maßnahmen einnehmen, welche durch eine reduzierte Genexprimierung, z.B. aufgrund von Promotormethylierungen, entstehen kann. Ein potentieller Therapieansatz der pädiatrischen Tumore besteht in der Hochregulation von CASP8 durch Interferon- $\gamma$  und Decitabin [Pingoud-Meier *et al.* 2003, Lindsey *et al.* 2004,

Meister *et al.* 2007]. Die Kombination aus Chemotherapeutika und monoklonalen Antikörpern, die gegen antiapoptotische Signale gerichtet sind und beispielsweise die Caspase 8-Aktivität steigern, bietet die Möglichkeit eines neuen Therapieprinzips [Keating *et al.* 2012].

#### 5.6.2.3 GATA5

Die MLPA-Analyse von GATA5 (*GATA-binding protein 5*) ergab zahlreiche Kopienzahlveränderungen. Die Primärtumore bestachen durch ihren Reichtum an Amplifikationen (7 Positivnachweise). Das Tumorsuppressorgen reguliert Prozesse der Zellreifung und -differenzierung in der embryonalen und postnatalen Entwicklung diverser Organsysteme [Morrissey *et al.* 1997, Zheng *et al.* 2011]. Eine Überexpression wäre demnach mit dem Erscheinungsalter von Medulloblastomen vereinbar. Eine Assoziation des Gens zur Karzinogenese wäre potentiell möglich, da multiple Mechanismen, wie Mutation, Überexpression, Genausschaltung oder der Einfluss von Onkoproteinen, die GATA5-Aktivität beeinflussen können. Eine gestörte Expression des Tumorsuppressorgens, bei der die betroffenen Zellen den regulären Zellzyklus verlassen und unkontrolliert proliferieren, ermöglicht eine maligne Transformation [Zheng *et al.* 2011]. Die angestellten Korrelationsanalysen zeigten einen statistisch relevanten Zusammenhang zwischen GATA5-Amplifikationen und dem vermehrten Nachweis von Apoptosevorgängen ( $p=0,029$  zweiseitig getestet), was durch die regulatorische Funktion des Gens auf den Zellzyklus erklärt werden kann. Zudem erwies sich das TSG als Einflussfaktor auf eine Rezidivausbildung. Mit statistischer Signifikanz ergab sich für Genamplifikationen ein gehäuftes Wiederkehren des Tumorleidens ( $p=0,038$  zweiseitig getestet). Dieser Zusammenhang entzieht sich einer logischen Schlussfolgerung und beruht wahrscheinlich auf den bereits genannten Einflussfaktoren (Abhängigkeit vom Probenmaterial) bzw. Fehlerquellen der Versuchsdurchführung (siehe Kapitel 5.2 bis 5.4). Denkbar wäre beispielsweise eine Ergebnisverfälschung durch die Detektion von Amplifikationen der Paraffinproben (4 Positivergebnisse), deren Aussagekraft eingeschränkt sein kann.

Im Gegensatz dazu wurden 5 Deletionen des Gens, auffälliger Weise in allen Proben der Zellkulturlinien, ermittelt. Diese Kopienzahlverminderungen könnten mit einer reduzierten Genexprimierung und der Genese von Medulloblastomen in Verbindung stehen. Damit wurde außerdem das unterschiedliche Mutationsverhalten der verschiedenen Probengruppen bestätigt (vergleiche Kapitel 5.4 sowie 5.6.2.1).

Die Auswertung der MS-MLPA konnte keine Promotormethylierungen des Tumorsuppressorgens herausarbeiten, was dem bisherigen Forschungsstand entspricht. Es scheint, dass epigenetische Veränderungen von GATA5 keine Bedeutung für die Tumorentstehung, Prognose oder Therapie von Medulloblastomen haben.

#### 5.6.2.4 MGMT

Das Reparaturgen MGMT (*O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase*) codiert ein Protein, das fehlgelagerte Alkyladdukte der DNA mit zytotoxischer bzw. mutagener Wirkung entfernt, was eine Resistenz gegen alkylierende Chemotherapeutika vermittelt [Esteller and Herman 2004, Bobola *et al.* 2005]. Die Analyse des TSGs bezüglich Kopienzahlveränderungen bot wenig Auffälligkeiten. Lediglich 5 Deletionen, von denen primär die Zellkulturlinien betroffen waren, fielen ins Auge. Eine darauf begründbare, verminderte Expression von MGMT führt zur Anhäufung von Chromosomenanomalien und begünstigt eine maligne Entartung [Jeuken *et al.* 2007].

Der Methylierungsstatus des Reparaturgens in den untersuchten Medulloblastomzellen ergab 15 Positivergebnisse, ausschließlich in der Gruppe der Primärtumore zu erheben. Für die Zellkulturlinien konnten keine Methylierungen datiert werden. Die Betrachtung epigenetischer Veränderungen der Zellreihe DAOY (Z1) lieferte bislang sowohl Positiv- als auch Negativresultate [Ebinger *et al.* 2006, Faoro *et al.* 2011]. Diese Ambivalenz ist eventuell auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden zurückzuführen. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch die Variabilität des MGMT-Status von Medulloblastomzellen, welche bereits mehrfach bestätigt wurde. Rood *et al.* konnten Hypermethylierungen des Reparaturgens in den pädiatrischen Tumoren nachweisen, welche jedoch keinen Bezug zur Genexpression zeigten [Rood *et al.* 2004]. Ebinger *et al.* konnten keine Methylierungen des TSGs in Primärtumoren erheben [Ebinger *et al.* 2006]. Im Jahr 2011 wurde ein inverser Zusammenhang zwischen Genmethylierung und Proteinexpression ermittelt, allerdings konnte keine Korrelation zur Überlebenszeit eruiert werden [Faoro *et al.* 2011]. Eine vielgestaltige Genexprimierung bietet sich nicht nur in Abhängigkeit zum gewählten Nachweisverfahren, sondern auch zum Untersuchungszeitpunkt. Hierbei sollte der Einfluss einer Chemotherapie auf die Entstehung neuer bzw. zusätzlicher Genmutationen bedacht werden [von Bueren *et al.* 2012].

Eine Ausschaltung von MGMT durch Promotorhypermethylierung gilt ohne Therapie als ungünstiger Prognosefaktor [Esteller and Herman 2004, Jeuken *et al.* 2007]. Dem widerspricht der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Trend zwischen MGMT-

Hypermethylierung und negativem Tumorzellnachweis im Liquorbefund. Dieser erweckt den Eindruck, dass epigenetische Veränderungen einen milderen klinischen Verlauf bedingen. Einen Erklärungsansatz bietet die Heterogenität des klinischen Erscheinungsbildes der kindlichen Hirntumore, welche kein Staging hinsichtlich Morphologie und Metastasierung ermöglicht (siehe Kapitel 1.1.1). Trotzdem sollten Prädiktoren bzw. Fehlerquellen innerhalb der Versuchsdurchführung (siehe Kapitel 5.2 bis 5.4) nicht ungeachtet bleiben.

Eine verminderte MGMT-Expression, die durch Promotorhypermethylierung hervorgerufen werden kann, setzt die Reparaturkapazität von Tumorzellen herab und bewirkt eine Chemosensitivität gegenüber Alkylantien, zu deren Vertretern Lomustin als Therapiekomponente von Medulloblastomen zählt [Esteller and Herman 2004, Rood *et al.* 2004, Hegi *et al.* 2005, Jeuken *et al.* 2007]. Unter Chemotherapie sterben methylierte Tumorzellen, die verbleibenden, nicht-methylierten Zellen vermitteln eine Therapie-induzierte Zytostatikaresistenz [Jeuken *et al.* 2007]. Eine Behandlung von Gliomen mit Carmustin bei positivem Methylierungsstatus konnte ein besseres Gesamtüberleben und ein längeres progressionsfreies Intervall erzielen [Esteller and Herman 2004]. Unter Temozolomid- und Radiotherapie konnte für Glioblastome mit nachgewiesener Hypermethylierung von MGMT eine signifikant verlängerte Überlebenszeit ermittelt werden [Hegi *et al.* 2005]. Oligodendrogliome zeigen einen hohen Anteil an Promotorhypermethylierungen, der ein gutes Ansprechen auf eine Temozolomidgabe bedingt [Jeuken *et al.* 2007]. Die Verstärkung einer Chemotherapie mit Alkylanzien durch MGMT-Inhibitoren wie O<sup>6</sup>-Benzylguanin ist Bestandteil zahlreicher Studien [Rood *et al.* 2004, Bobola *et al.* 2005, von Bueren *et al.* 2012]. Eine potentielle MGMT-Reaktivierung durch demethylierende Substanzen würde zwar die chromosomale Stabilität betroffener Zellen fördern, aber einem Therapieerfolg von alkylierenden Zytostatika entgegenwirken [Esteller and Herman 2004, Jeuken *et al.* 2007].

Aufgrund einer vermeintlichen Heterogenität von MGMT bezüglich Methylierungsverhalten und Genexpression ist dessen Bedeutung für die Diagnostik und Therapie von Medulloblastomen schwer abzuschätzen [Esteller and Herman 2004, Rood *et al.* 2004, Faoro *et al.* 2011]. In Anbetracht therapieentscheidender Konsequenzen ist es unumgänglich, den MGMT-Status der kindlichen Hirntumoren zukünftig näher zu klassifizieren.

#### 5.6.2.5 MSH6

Das Reparaturgen MSH6 (*MutS homolog 6*) präsentierte in der MLPA-Analyse 5 Amplifikationen der Primärtumore. Obgleich eine Kopienzahlerhöhung des TSGs untypisch erscheint, könnte diese mit einer, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe, erhöhten Genexpression in Medulloblastomen vereinbar sein, welche bereits nachgewiesen werden konnte [von Bueren *et al.* 2012]. Ein gesteigerte Zellproliferation, die mit Reparatur- und Abbauprozessen vergesellschaftet ist, könnte eine möglich Ursache dafür sein [Poley *et al.* 2007]. Damit geht auch die ermittelte Signifikanz zwischen positivem Amplifikationsergebnis und Apoptosenachweis konform ( $p=0,029$  zweiseitig getestet). Der Deletionsstatus des Reparaturgens zeigte 7 Positivergebnisse, von denen überwiegend die Zellkulturlinien betroffen waren. Damit bestätigen sich abermals die genetischen Unterschiede der analysierten Probengruppen (Vergleich Kapitel 5.4, 5.6.2.1 sowie 5.6.2.3 und 5.6.2.4).

Mit 18 von 25 möglichen Methylierungen (entsprechend dem Gesamtprobenumfang) lieferte MSH6 den Maximalwert aller untersuchten Tumorsuppressorgene. Eine vollständige Genausschaltung und Expressionsminderung, möglicherweise durch Deletionen oder Promotorhypermethylierung hervorgerufen, prädestiniert für eine Tumorentstehung. Diese trifft, wie auch bei Medulloblastomen, vornehmlich im Kindesalter auf [Poley *et al.* 2007, Scott *et al.* 2007, Ilencikova *et al.* 2011]. Ein Erklärungsansatz geht davon aus, dass das Mismatch-Reparatur-System erst postnatal ausreift, sodass Genmutationen, die eine Karzinogenese bedingen, nicht frühzeitig eliminiert werden können [Ilencikova *et al.* 2011]. Hypermethylierungen des MSH6-Gens wurden bereits in der ersten MS-MLPA-Untersuchung an Medulloblastomen im Jahr 2009 ermittelt [Viana-Pereira *et al.* 2009]. Folglich können sowohl das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren als auch die erhobenen Ergebnisse als valide betrachtet werden. Die angestellten Korrelationsanalysen zeigten eine Tendenz zu einer geminderten Expression der Neuronenspezifischen Enolase bei Vorliegen von epigenetischen Veränderungen des TSGs. Da für Hirntumore typischerweise ein gesteigerter NSE-Nachweis zu erwarten wären, sollte die Heterogenität des Erscheinungsbildes der Malignome Berücksichtigung finden (siehe Kapitel 1.1.1) [Giangaspero *et al.* 2007].

MSH6-Aberrationen bedingen ein fehlerhaftes Mismatch-Reparatur-System, was zur Resistenzentwicklung gegen bestimmte Chemotherapeutika, wie Temozolomid oder Cisplatin, führen kann [Fedier und Fink 2004, Yip *et al.* 2009]. Die eingesetzten



Zytostatika wären damit ineffektiv und würden durch ihre mutagene Wirkung auf betroffene Zellen den Tumorprogress sowie die Entstehung sekundärer Malignome sogar fördern [Fedier *und* Fink 2004, Scott *et al.* 2007]. Sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen von Glioblastomen zeigten, dass eine Chemotherapie mittels Temozolomid zur Inaktivierung des MSH6-Gens führt, was die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber dem Alkylanz reduziert. Eine Rekonstitution des Tumorsuppressorgens war mit einem erhöhten Ansprechen auf das Zytostatikum verbunden [Yip *et al.* 2009].

Für die Genese von Medulloblastomen können Aberrationen (vor allem Promotorhypermethylierungen) des Tumorsuppressorgens MSH6 durchaus bedeutsam sein. Ihre weitere Erforschung ist auch zur Vermeidung ineffektiver und schädigender Therapiemaßnahmen von großer Wichtigkeit [Scott *et al.* 2007].

#### 5.6.2.6 RASSF1A

Das RASSF1A (*Ras association domain-containing protein 1A*)-Gen zeigte hinsichtlich der erhobenen Kopienzahlveränderungen von Primärtumoren und Zellkulturlinien Parallelen zu anderen, in dieser Arbeit analysierten, Tumorsuppressorgenen (vergleiche Abschnitt 5.6.2.1, 5.6.2.3 bis 5.6.2.5). Es wurden 6 Amplifikationen der Primärtumore detektiert. Damit könnte eine RASSF1A-Expression assoziiert sein, welche mit einem reduzierten Wachstum und einer verminderten Aggressivität von Tumorzellen einhergehen kann und somit einen günstigen Prognosefaktor darstellt [Hesson *et al.* 2004, Agathangelou *et al.* 2005]. Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen Amplifikationsstatus und histopathologischem Apoptosenachweis herausgearbeitet. Dieser wird durch den Tatbestand verifiziert, dass RASSF1A in Medulloblastomzellen als Antwort auf DNA-Schäden hauptsächlich Apoptosevorgänge über intrinsische und extrinsische Signalwege vermittelt. Die gesteigerte Effektivität einer chemotherapeutischen Behandlung mit Cisplatin und Etoposid in Anwesenheit von RASSF1A verdeutlicht dessen proapoptotische Funktion [Levesley *et al.* 2011]. Die Deletionsanalyse des Regulationsgens ergab 7 Positivergebnisse, die, vergleichbar zu bereits beschriebenen TSGs, in allen Zellkulturproben zu finden waren.

Medulloblastome zeigen eine extrem gesteigerte RASSF1A-Hypermethylierung, welche mit der epigenetischen Ausschaltung des Gens in Verbindung steht [Lusher *et al.* 2002, Lindsey *et al.* 2004, Chang *und* Ng 2007]. Diese vermutlich bedeutsamste Genaberration von MB konnte in der vorliegenden Arbeit an 9 Kryokonservaten detektiert werden. Die

Zellkulturproben, von denen die DAOY-Zelllinie in Voruntersuchungen sowohl partielle Methylierungen als auch fehlende RASSF1A-Expression präsentiert hatte, zeigten ausnahmslos keine epigenetischen Veränderungen [Lusher *et al.* 2002, Lindsey *et al.* 2004, Levesley *et al.* 2011].

Tumorspezifische Hypermethylierungen der Promotorregion von RASSF1A charakterisieren die molekulargenetischen Eigenschaften von Medulloblastomen und tragen höchstwahrscheinlich zu deren Pathogenese bei [Lusher *et al.* 2002, Lindsey *et al.* 2004, Chang und Ng 2007]. Obgleich bislang keine Korrelation zu Aberrationen des Tumorsuppressorgens und dem klinischen Erscheinungsbild der pädiatrischen Hirntumore festgestellt werden konnte, lohnen sich fortsetzende Studien, um die Bedeutung des TSGs für die Prognose und Therapie dieser zu beleuchten. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre hierbei die Inhibition des Tumorwachstums durch eine Reexpression von RASSF1A mittels demethylierender Zytostatika [Lusher *et al.* 2002, Hesson *et al.* 2004, Lindsey *et al.* 2004, Chang und Ng 2007].

### 5.7 Risikostratifizierung von Medulloblastomen

Die Risikostratifikation von Medulloblastomen beruht derzeit auf klinischen und histopathologischen Befunden (siehe Kapitel 1.1.1) [Clifford *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2012]. Die Identifizierung von Subgruppen, die neben demographischen und klinischen auch molekulargenetische Charakteristika vereinen, konnte bislang keine Veränderungen für die Praxis bringen [Northcott *et al.* 2011, Robinson *et al.* 2012]. Neue Erkenntnisse über den Genstatus stellen die Grundlage für eine genauere Klassifizierung und eine moderne Risikostratifizierung dieser pädiatrischen Hirntumore.

Nach bisherigem Forschungsstand gelten Monosomien des 6. Chromosoms, welche in der WNT-Subgruppe zu finden sind, als günstige Prognoseprädiktoren [Clifford *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2012]. Ebenfalls bedeutsam sind Amplifikationen von Protoonkogenen der MYC-Familie, welche einen schlechten klinischen Verlauf vorhersagen [Northcott *et al.* 2009, Northcott *et al.* 2011, Pomeroy and Cho 2011, Taylor *et al.* 2012]. Zudem konnten Genaberrationen des Chromosoms 17, welche die 4. Subgruppe charakterisieren, als Risikofaktoren identifiziert werden. Der isolierte Verlust von 17p korrelierte mit einer verkürzten Überlebenszeit, wohingegen Amplifikationen von 17q mit einem besseren Outcome in Verbindung standen [Gulino *et al.* 2008, McCabe *et al.* 2011]. Mithilfe der angestellten MLPA-Analysen konnten weitere Genaberrationen, für die prognostische Bedeutungen für Medulloblastome bekannt sind, detektiert werden.

Beispielsweise können CTNNB1-Mutationen, von denen Amplifikationen gezeigt werden konnten, die molekulargenetische WNT-Subgruppe kennzeichnen, die eine gute Langzeitprognose aufweist [Clifford *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2012]. Die Überexpression des TSGs RASSF1A, für die Amplifikationsnachweise innerhalb dieser Arbeit sprechen, könnte den Tumorprogress mindern und mit einem günstigeren Krankheitsverlauf verknüpft sein [Hesson *et al.* 2004, Agathangelou *et al.* 2005]. Eine verminderte CASP8-Expression, welche durch den angestellten Methylierungsnachweis denkbar wäre, kann eine verkürzte Gesamtüberlebenszeit und folglich eine ungünstige Prognose des Tumorleidens voraussagen [Pingoud-Meier *et al.* 2003]. MGMT-Hypermethylierungen, welche ebenfalls ermittelt wurden, gelten zwar als ungünstiger Prognosefaktor, könnten aber auch für die Therapie von Medulloblastomen Erfolg versprechen [Esteller and Herman 2004, Rood *et al.* 2004, Hegi *et al.* 2005, Jeuken *et al.* 2007].

Die angestellten Untersuchungen brachten auch neue potentielle Prognoseprädiktoren hervor. So könnten beispielsweise die Onkogene FGF4, IGFBP5 sowie PPM1D die Tumorentstehung und -progression von Medulloblastomen fördern und ein Amplifikationsnachweis, wie ihn die vorliegende Arbeit erbrachte, mit einem schlechten Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht werden. Als Vertreter der Tumorsuppressorgene sollte ASC genannt werden, das durch einen Funktionsverlust, welcher sowohl mit detektierten Deletionen als auch Promotormethylierungen zu vereinbaren wäre, eine ungünstige Prognose ausmachen könnte. Auch eine reduzierte Genexpression von GATA5 (hier mit Deletionen assoziierbar) könnte die Tumorentstehung unterstützen und mit einer negativen Vorhersage in Verbindung gebracht werden.

Die innerhalb dieser Arbeit angestellten Korrelationsanalysen konnten zudem einen Trend zwischen Promotormethylierungen des Tumorsuppressorgens TP53 und einer Rezidivausbildung bei primären Medulloblastomen aufzeigen.

Die angestellten Überlegungen könnten neue genetische Klassifizierungsmerkmale und Prognoseprädiktoren der kindlichen Tumore hervorbringen, welche auch für Therapiemaßnahmen und deren Erfolge Bedeutung haben könnten (siehe Kapitel 5.8).

## 5.8 Ausblick

Das MLPA-Verfahren bietet neben einer genauen Erfassung von Kopienzahlveränderungen einzelner Genabschnitte auch die Möglichkeit der Detektion epigenetischer Veränderungen [Northcott *et al.* 2010]. Für diagnostische Maßnahmen zur Analyse chromosomaler Aberrationen ist die Methodik, auch aufgrund berechtigter

Einschränkungen (siehe Kapitel 5.3.2), aktuell jedoch nicht zertifiziert [Schouten *et al.* 2008]. Obgleich bereits Erwägungen zum Einsatz der MLPA in der Routinediagnostik, zum Beispiel von hämatonkologischen Krankheitsbildern, bestehen, ist das Verfahren bisher nur ergänzend zu Standardmethoden zu verwenden [Véronèse *et al.* 2013]. Die Optimierung der MLPA-Methode und deren Etablierung in der Routineuntersuchung genetisch vererbbarer und onkologischer Erkrankungen stellen zukünftige Ziele dar.

Der Erwerb molekulargenetischer Erkenntnisse über Medulloblastome bietet die Grundlage für eine genauere Klassifizierung der Hirntumore. Daher wäre es durchaus überlegenswert, einen für Medulloblastome spezifischen (MS-)MLPA-Kit zu entwerfen, der sowohl in der Grundlagenforschung als auch für diagnostische und prognostische Zwecke in der klinischen Versorgung einsetzbar wäre. Dieser Probenkit sollte die genauere Untersuchung der Chromosomen 1, 5, 6, 10 und 17 ermöglichen. Für die Detektion tumorspezifischer Genaberrationen sollten neben den bereits geprüften Onkogenen, wie CTNNB1 und PPM1D, zusätzliche Gene, beispielsweise ERBB2, GLI1, OTX2 und EZH2 sowie das Protoonkogen MYC, analysiert werden. Die Erhebung des Methylierungsstatus sollte neben den Tumorsuppressorgenen RASSF1A, CASP8 und MGMT, die in der vorliegenden Arbeit bereits bewertet wurden, auch PTCH sowie neuerlich hinzugekommene TSGs wie EHMT1 beinhalten (Vergleich Kapitel 1.2).

Die Erweiterung diagnostischer Möglichkeiten durch das MLPA-Verfahren könnte eine neue Risikostratifikation von Medulloblastomen bedingen (siehe Kapitel 5.7). Die Ermittlung des genetischen Status könnte in Staging-Verfahren zur prognostischen Einschätzung des klinischen Verlaufs eingebunden werden. Hierzu könnten beispielsweise Aberrationen putativer Gene in Blutproben von Patienten bestimmt und bewertet werden. Ähnliche Überlegungen wurden bereits für das Screening von Brusttumoren getroffen, in dem Promotormethylierungen von RASSF1A eine tragende Rolle einnahmen [Kloten *et al.* 2013].

Mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse könnten die bisherigen Behandlungsprinzipien überholt werden, nach denen alle Patienten dieselbe Kombinationstherapie erhalten, welche einerseits für molekulargenetisch klassifizierte Gruppen mit schlechter Prognose (Subgruppe 3) unzureichend ist, andererseits zu einer Überbehandlung bei vermeintlich günstigem Krankheitsverlauf (WNT-Gruppe) führt [Robinson *et al.* 2012, Taylor *et al.* 2012]. Eine gezielte Intervention entsprechend der genetischen Aberrationen (von molekularbiologischen Untergruppen der kindlichen Hirntumore) würde eine größere

Wirksamkeit bei geringerer Toxizität versprechen [Gilbertson 2004, Clifford *et al.* 2006, Rudin *et al.* 2009, Robinson *et al.* 2012]. So könnte beispielsweise bei nachgewiesenen MSH6-Aberrationen auf den Einsatz von Temozolomid oder Cisplatin verzichtet werden, welche eine Resistenzentwicklung und Ineffektivität zur Folge haben könnten (siehe Kapitel 5.6.2.5) [Fedier und Fink 2004, Yip *et al.* 2009]. Bei ermittelter FGF4-Überexpression könnten möglicherweise unwirksame antiangiogenetische Pharmaka eingespart werden (vergleiche Abschnitt 5.6.1.1) [Yoshida *et al.* 1994, Lieu *et al.* 2011]. Die Kenntnis um eine Chemosensitivität gegenüber Alkylanzien, wie Lomustin oder Temozolomid, die eine verminderte MGMT-Expression mit sich bringt, sollte ausgenutzt werden (siehe Kapitel 5.6.2.4) [Esteller and Herman 2004, Rood *et al.* 2004, Hegi *et al.* 2005, Jeuken *et al.* 2007]. Es wäre denkbar, dass Temozolomid Einzug in das Therapieregime von Medulloblastomen hält und damit, vergleichbar zu höhergradigen Gliomen, die Überlebenszeit der Patienten verbessern kann [Hegi *et al.* 2005]. Der unterstützende Einsatz von MGMT-Inhibitoren wie O<sup>6</sup>-Benzylguanin könnte den Behandlungserfolg steigern [Rood *et al.* 2004, Bobola *et al.* 2005, von Bueren *et al.* 2012]. Weiterhin könnte die Aktivierung von Tumorsuppressorgenen wie ASC, CASP8 oder RASSF1A durch den Einsatz demethylierender Substanzen (Decitabin) mit einer Inhibition des Tumorprogresses, einer effektiveren Zytostatikatherapie und/oder einer besseren Prognose einhergehen [Masumoto *et al.* 1999, Conway *et al.* 2000, Lusher *et al.* 2002, Pingoud-Meier *et al.* 2003, Hesson *et al.* 2004, Lindsey *et al.* 2004, Chang und Ng 2007, Meister *et al.* 2007, Levesley *et al.* 2011, Hong *et al.* 2013]. Die Förderung der Aktivität von TSGs durch monoklonale Antikörper sowie die gezielte Hemmung von Onkogenen durch selektive Inhibitoren, welche wichtige Signalwege beeinflussen können, bieten zusätzlich neue Therapieansätze [Gilbertson 2004, Rayter *et al.* 2008, Rudin *et al.* 2009, Keating *et al.* 2012].

Im Hinblick auf ein verbessertes Verständnis der Tumorbilogie von Medulloblastomen und der Erschließung neuer prognostischer Möglichkeiten sollte die Erfassung tumorspezifischer Kopienzahlveränderungen sowie Promotorhypermethylierungen Mittelpunkt nachfolgender Forschungsarbeiten sein. Damit könnte außerdem die Suche nach therapeutischen Targets von molekulargenetisch definierten Subgruppen, welche sich bislang aufgrund der genetischen Heterogenität der pädiatrischen Tumore schwierig gestaltete, bereichert werden [Northcott *et al.* 2009, Northcott *et al.* 2011]. Wünschenswerte Ziele wären eine Therapieoptimierung sowie die Verbesserung von Lebenszeit und -qualität betroffener Patienten in naher Zukunft.

## 6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden genetische und epigenetische Veränderungen von Medulloblastomzellen mithilfe des MLPA- bzw. MS-MLPA-Verfahrens analysiert und bewertet. Hierbei konnten signifikante Unterschiede des Mutationsverhaltens primärer Tumore im Vergleich zu humanen Medulloblastomzelllinien herausgearbeitet werden. Während die Proben der Zellkulturlinien einen höheren Anteil an Kopienzahlveränderungen zeigten, imponierten die Primärtumore durch ihren Reichtum an Promotorhypermethylierungen. Unter Einbeziehung klinischer Daten konnte festgehalten werden, dass ein erhöhter Anteil an Kopienzahländerungen mit einem positiven Tumorzellnachweis im Liquor vergesellschaftet war. Zusätzlich ergab sich ein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus analysierter Proben und einem histopathologischen Nachweis von Nekrosen. Diese Ergebnisse deuteten auf den Einfluss von Genaberrationen auf das makro- und mikroskopische Erscheinungsbild von Medulloblastomen hin. Durch die erhobenen Untersuchungsergebnisse konnten einige bereits bekannte Aberrationen der pädiatrischen Hirntumore bestätigt werden, was die Validität des MLPA-Verfahrens unterstreicht. Gleichzeitig wurden neue Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene vermerkt, die mögliche Einflussfaktoren einer Tumorentstehung und -progression darstellen könnten. Auch die klinische Korrelation häufig involvierter Gene erbrachte interessante Schlussfolgerungen bezüglich der Einflussnahme von Genmutationen auf die Krankheitsausprägung. Des Weiteren konnte ein Einfluss des Zugewinns oder Verlusts größerer chromosomaler Abschnitte auf Genaberrationen vermutet werden.

Das (MS-)MLPA-Verfahren hat sich als zuverlässige Untersuchungsmethode zur genetischen Charakterisierung von Medulloblastomzellen bewähren können. Die Anwendbarkeit für verschiedene Probenmaterialien (Paraffin-eingebettete und kryokonservierte Exemplare sowie Proben kultivierter Zelllinien) konnte bestätigt werden, wobei deren Aussagekraft für genetische und epigenetische Untersuchungen divergierte. Kryokonservate wurden aufgrund ihrer potentiellen Validität favorisiert.

Ein zukünftiger Einsatz des PCR-Verfahrens als diagnostisches und prognostisches Hilfsmittel könnte die medizinische Versorgung der betroffenen Patienten verbessern und zur Optimierung von Therapieverfahren beitragen. Weitere Studien zur genaueren Charakterisierung tumorspezifischer Aberrationen sollten im Hinblick auf ein verbessertes Verständnis der Entstehung und Progression von Medulloblastomen folgen.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. 2005. Role of the Ras-Association Domain Family 1 Tumor Suppressor Gene in Human Cancers. *Cancer Res*, 65(9):3497-3508.

Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. 2007. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet*, 8:9.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>rd</sup> Edition New York: Garland Science.

Alitalo K. 1984. Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. *Med Biol*, 62(6):304-317.

Banelli B, Casciano I, Croce M, Di Vinci A, Gelvi I, Pagnan G, Brignole C, Allemanni G, Ferrini S, Ponzoni M, Romani M. 2002. Expression and methylation of CASP8 in neuroblastoma: identification of a promotor region. *Nat Med*, 8(12):1333-1335.

Bayani J, Zielenska M, Marrano P, Kwan Ng Y, Taylor MD, Jay V, Rutka JT, Squire JA. 2000. Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J Neurosurg*, 93(3):437-448.

Baylin SB. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2Suppl1:S4-11.

Becker MA, Hou X, Harrington SC, Weroha SJ, Gonzalez SE, Jacob KA, Carboni JM, Gottardis MM, Haluska P. 2012. IGFBP Ratio Confers Resistance to IGF Targeting and Correlates with Increased Invasion and Poor Outcome in Breast Tumors. *Clin Cancer Res*, 18(6):1808-1817.

Bobola MS, Silber JR, Ellenbogen RG, Geyer JR, Blank A, Goff RD. 2005. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNAMethyltransferase, O<sup>6</sup>-Benzylguanine, and Resistance to Clinical Alkylators in Pediatric Primary Brain Tumor Cell Lines. *Clin Cancer Res*, 11(7):2747-2755.

- Bortz J, Lienert GA. 2008. Kurzgefasste Statistik für die Klinische Forschung. Dritte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Brison O. 1993. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1155(1):25-41.
- Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace AJ, Appella E. 2002. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet*, 31(2):210-215.
- Castellino RC, De Bortoli M, Lu X, Moon SH, Nguyen TA, Shepard MA, Rao PH, Donehower LA, Kim JY. 2008. Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *J Neurooncol*, 86(3):245-256.
- Chang CH, Housepian EM, Herbert C. 1969. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology*, 93:1351-1359.
- Chang Q, Ng HK. 2007. Different hypermethylation status of RASSF1A in medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumor. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 36(1):24-28.
- Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, Ellison DW. 2006. Wnt/Wingless Pathway Activation and Chromosome 6 Loss Characterize a Distinct Molecular Sub-Group of Medulloblastomas Associated with a Favorable Prognosis. *Cell Cycle*, 5(22):2666-2670.
- Collins VP. 2004. Brain tumors: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, SupplII:ii2-11.
- Combaret V, Iacono I, Bréjon S, Schleiermacher G, Pierron G, Couturier J, Bergeron C, Blay JY. 2012. Analysis of genomic alterations in neuroblastoma by multiplex ligation-dependent probe amplification and array comparative genomic hybridization: a comparison of results. *Cancer Genet*, 205(12):657-664.



- Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM. 2000. TMS1, a Novel Proapoptotic Caspase Recruitment Domain Protein, Is a Target of Methylation-induced Gene Silencing in Human Breast Cancers. *Cancer Res*, 60(22):6236-6242.
- Cook WD *and* McCaw BJ. 2000. Accommodating haploinsufficient tumor suppressor genes in Knudson's model. *Oncogene*, 19(30):3434-3438.
- Corthals A *and* Desalle R. 2005. An Application of Tissue and DNA Banking for Genomics and Conservation: The Ambrose Monell Cryo-Collection (AMCC). *Syst Biol*, 54(5):819-823.
- de Bont JM, van Doorn J, Reddingius RE, Graat GH, Passier MM, den Boer ML, Pieters R. 2008. Various components of the insulin-like growth factor system in tumor tissue, cerebrospinal fluid and peripheral blood of pediatric medulloblastoma and ependymoma patients. *Int J Cancer*, 123(3):594-600.
- Duplan SM, Théorêt Y, Kenigsberg RL. 2002. Antitumor Activity of Fibroblast Growth Factors (FGFs) for Medulloblastoma May Correlate with FGF Receptor Expression and Tumor Variant. *Clin Cancer Res*, 8(1):246-257.
- Ebinger M, Senf L, Scheurlen W. 2006. Screening molekularbiologischer Marker zur Risikostratifizierung bei Medulloblastomen. *Klin Pädiat*, 218(3):139-142.
- Esteller M *and* Herman JG. 2004. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene*, 23(1):1-8.
- Ewald C. 2009. Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung inaktivierter Tumorsuppressorgene und der Fettsäuresynthese für das biologische Verhalten von Meningeomen [Habilitation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ewald C, Hofmann T, Kuhn S, Deufel T, Beetz C, Kalff R. 2008. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification in meningiomas. *J Neurooncol*, 90(3):267-273.

Faoro D, von Bueren AO, Shalaby T, Sciuscio D, Hürlimann ML, Arnold L, Gerber NU, Haybaeck J, Mittelbronn M, Rutkowski S, Hegi M, Grotzer MA. 2011. Expression of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in childhood medulloblastoma. *J Neurooncol*, 103(1):59-69.

Fedier A, Fink D. 2004. Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol*, 24(4):1039-1047.

Ferguson AE, Cohn RJ, Ashton LJ. 2012. Use of formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue as a DNA source in molecular epidemiological studies of pediatric CNS tumors. *Diagn Mol Pathol*, 21(2):105-113.

Fruehwald-Pallamar J, Puchner SB, Rossi A, Garre ML, Cama A, Koelblinger C, Osborn AG, Thurnher MM. 2011. Magnetic resonance imaging spectrum of medulloblastoma. *Neuroradiology*, 53(6):387-396.

Giangaspero F, Eberhardt CG, Haapasalo H, Pietsch T, Wiestler OD, Ellison DW. 2007. Medulloblastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Hrsg. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. 4<sup>th</sup> Edition Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Gilbertson RJ. 2004. Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncol*, 5(4):209-218.

Gray JW *and* Collins C. 2000. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis*, 21(3):443-452.

Grombacher T, Mitra S, Kaina B. 1996. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis*, 17(11):2329-2336.

Gruber-Olipitz M, Ströbel T, Kang S, John J, Grotzer M, Slave I, Lubec G. 2009. Neurotrophin3/TrkC-regulated proteins in the human medulloblastoma cell line DAOY. *Electrophoresis*, 30:540-549.

Gulino A, Arcella A, Giangaspero F. 2008. Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Curr Opin Oncol*, 20(6):668-675.

- Guo M, Akiyama Y, House MG, Hooker CM, Heath E, Gabrielson E, Yang SC, Han Y, Baylin SB, Herman JG, Brock MV. 2004. Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 10(23):7917-7924.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10):997-1003.
- Herman JG *and* Baylin SB. 2003. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med*, 349(21):2042-2054.
- Hesson L, Bièche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F. 2004. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene*, 23(13):2408-2419.
- Höhlriegel N. 2003. Der Einfluss von neurotrophen Faktoren auf das biologische Verhalten von Medulloblastomen [Dissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität.
- Hoffmann T. 2008. Bestimmung von Kopienzahlveränderungen und Methylierungen der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen bei Hirntumoren verschiedener Entitäten mittels MS-MLPA [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Hong S, Hwang I, Lee YS, Park S, Lee WK, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Kim YS, Yu JW. 2013. Restoration of ASC expression sensitizes colorectal cancer cells to genotoxic stress-induced caspase-independent cell death. *Cancer Lett*, doi:10.1016/j.canlet.2012.12.020.
- Huber H, Eggert A, Janss AJ, Wiewrodt R, Zhao H, Sutton LN, Rorke LB, Grotzer MA. 2001. Angiogenetic profile of childhood primitive neuroectodermal brain tumors/medulloblastomas. *Eur J Cancer*, 37(16):2064-2072.
- Ilencikova D, Sejnova D, Jindrova J, Babal P. 2011. High-Grade Brain Tumors in Siblings with Biallelic MSH6 Mutations. *Pediatr Blood Cancer*, 57(6):1067-1070.
- Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. 2004. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 104(1-4):14-20.

- Jacobsen P, Jenkyn D, Papadimitriou J. 1985. Establishment of a Human Medulloblastoma Cell Line and Its Heterotransplantation into Nude Mice. *J Neuropath Exp Neurol*, 44(5):472-485.
- Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijsen S, Wesseling P. 2006. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn*, 8(4):433-443.
- Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, Bootz-Sprenger SH, Wesseling P. 2007. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest*, 87(10):1055-1065.
- Jones PA and Baylin SB. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3(6):415-428.
- Keating J, Tsoli M, Hallahan AR, Ingram WJ, Haber M, Ziegler DS. 2012. Targeting the Inhibitor of Apoptosis Proteins as a Novel Therapeutic Strategy in Medulloblastoma. *Mol Cancer Ther*, 11(12):2654-2663.
- Khatua S, Sadighi ZS, Pearlman ML, Bocharé S, Vats TS. 2012. Brain Tumors in Children- Current Therapies and Newer Directions. *Indian J Pediatr*, doi10.1007/s12098-012-0689-9.
- Kloten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, Veeck J, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. 2013. Promotor hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3 and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res*, 15(1):R4.
- Knudson AG. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4):820-823.
- Knudson AG. 1989. Nakahara memorial lecture. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Princess Takamatsu Symp*, 20:15-29.
- Knudson AG. 2002. Cancer Genetics. *Am J Med Gen*, 111(1):96-102.

- Lambros MB, Natrajan R, Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Dedes KJ, Savage K, Lacroix-Triki M, Jones RL, Lord CJ, Linardopoulos S, Ashworth A, Reis-Filho JS. 2010. PPM1D gene amplification and overexpression in breast cancer: a qRT-PCR and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol*, 23(10):1334-1345.
- Lee Y, Miller HL, Jensen P, Hernan R, Connelly M, Wetmore C, Zindy F, Roussel MF, Curran T, Gilbertson RJ, McKinnon PJ. 2003. A Molecular Fingerprint for Medulloblastoma. *Cancer Res*, 63(17):5428-5437.
- Lehmann U *and* Kreipe H. 2001. Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *Methods*, 25(4):409-418.
- Levesley J, Lusher ME, Lindsey JC, Clifford SC, Grundy R, Coyle B. 2011. RASSF1A and the BH3-only mimetic ABT-737 promote apoptosis in pediatric medulloblastoma cell lines. *Neuro Oncol*, 13(12):1265-1276.
- Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ, Rosenblum M, Mikkelsen T, Zenklusen JC, Fine HA. 2008. Genomic Changes and Gene Expression Profiles Reveal That Established Glioma Cell Lines Are Poorly Representative of Primary Human Gliomas. *Mol Cancer Res*, 6(1):21-30.
- Lieu C, Heymach J, Overman M, Tran H, Kopetz S. 2011. Beyond VEGF: Inhibition of the Fibroblast Growth Factor Pathway and Antiangiogenesis. *Clin Cancer Res*, 17(19):6130-6139.
- Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Bailey S, Gilbertson RJ, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC. 2004. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. *Carcinogenesis*, 25(5):661-668.
- Lo AWI, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP. 2002. DNA Amplification by Breakage/Fusion/Bridge Cycles Initiated by Spontaneous Telomere Loss in a Human Cancer Cell Line. *Neoplasia*, 4(6):531-538.
- Luczak MW *and* Jagodzinski PP. 2006. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem et Cytobiol*, 44(3):143-154.

- Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC. 2002. Biallelic Epigenetic Inactivation of the RASSF1A Tumor Suppressor Gene in Medulloblastoma Development. *Cancer Res*, 62(20):5906-5911.
- Martinez R, Setien F, Voelter C, Casado S, Quesada MP, Schackert G, Esteller M. 2007. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis*, 28(6):1264-1268.
- Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J. 1999. ASC, a Novel 22-kDa Protein, Aggregates during Apoptosis of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*, 274(48):33835-33838.
- McCabe MG, Bäcklund LM, Leong HS, Ichimura K, Collins VP. 2011. Chromosom 17 alterations identify good-risk and poor-risk tumors independently of clinical factors in medulloblastoma. *Neuro Oncol*, 13(4):376-383.
- Meister N, Shalaby T, von Bueren AO, Rivera P, Patti R, Oehler C, Pruschy M, Grotzer MA. 2007. Interferon- $\gamma$  mediated up-regulation of caspase-8 sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy. *Eur J Cancer*, 43(12):1833-1841.
- Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, Kokocinski F, Benner A, Stange DE, Neben K, Fiegler H, Carter NP, Reifemberger G, Korshunov A, Lichter P. 2005. Genomic and Protein Expression Profiling Identifies CDK6 As Novel Independent Prognostic Marker in Medulloblastoma. *J Clin Oncol*, 23(34):8853-8862.
- Montagna M, Dalla Palma M, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E. 2003. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet*, 12(9):1055-1061.
- Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS. 1997. GATA-5: A Transcriptional Activator Expressed in a Novel Temporally and Spatially-Restricted Pattern during Embryonic Development. *Dev Biol*, 183(1):21-36.

- Natté R, van Eijk R, Eilers P, Cleton-Jansen AM, Oosting J, Kouwenhove M, Kros JM, van Duinen S. 2005. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of 1p and 19q chromosomal loss in oligodendroglial tumors. *Brain Pathol*, 15(3):192-197.
- Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD. 2011. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *J Clin Oncol*, 29(11):1408-1414.
- Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A, Ra YS, Zilberberg K, McLeod J, Scherer SW, Sunil Rao J, Eberhart CG, Grajkowska W, Gillepsie Y, Lach B, Grundy R, Pollack IF, Hamilton RL, Van Meter T, Carlotti CG, Boop F, Bigner D, Gilbertson RJ, Rutka JT, Taylor MD. 2009. Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat Genet*, 41(4):465-472.
- Northcott PA, Rutka JT, Taylor MD. 2010. Genomics of medulloblastoma: from Giemsa-banding to next-generation sequencing in 20 years. *Neurosurg Focus*, 28(1):E6.
- Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. 2005. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*, 33(14):e128.
- Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 2(3):reviews3005.1-3005.12.
- Packer RJ, Sutton LN, Goldwein JW, Perilongo G, Bunin G, Ryan J, Cohen BH, D'Angio G, Kramer ED, Zimmerman RA, Rorke LB, Evans AE, Schut L. 1991. Improved survival with the use of adjuvant chemotherapy in the treatment of medulloblastoma. *J Neurosurg*, 74(3):433-440.
- Parsons MJ *and* Vertino PM. 2006. Dual role of TMS1/ASC in death receptor signaling. *Oncogene*, 25(52):6948-6458.
- Pastwa E *and* Blasiak J. 2003. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol*, 50(4):891-908.

- Payne SR *and* Kemp CJ. 2005. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*, 26(12):2031-2045.
- Peters I, Eggers H, Atschekzei F, Hennenlotter J, Waalkes S, Tränkenschuh W, Großhennig A, Merseburger AS, Stenzl A, Kuczyk MA, Serth J. 2012. GATA5 CpG island methylation in renal cell cancer: a potential biomarker for metastasis and disease progression. *BJU Int*, doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10862.x.
- Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C, Schmidt D, Reinhard Ö, Freihoff D, Albrecht S, Wiestler OA, Zeltzer P, Riehm H. 1994. Characterization of Five New Cell Lines Derived from Human Primitive Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System. *Cancer Res*, 54:3278-3287.
- Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, Rorke LB, Phillips PC, Shalaby T, Grotzer MA. 2003. Loss of Caspase-8 Protein Expression Correlates with Unfavorable Survival Outcome in Childhood Medulloblastoma. *Clin Cancer Res*, 9(17):6401-6409.
- Poley JW, Wagner A, Hoogmans MM, Menko FH, Tops C, Kros JM, Reddingius RE, Meijers-Heijboer H, Kuipers EJ, Dinjens WN. 2007. Biallelic Germline Mutations of Mismatch-repair Genes. *Cancer*, 109(11):2349-2356.
- Pomeroy SL *and* Cho YJ. 2011. Molecular fingerprints of medulloblastoma and their application to clinical practice. *Future Oncol*, 7(3):327-329.
- Quon KC *and* Berms A. 2001. Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev*, 15(22):2917-2921.
- Rayter S, Elliot R, Travers J, Rowlands MG, Richardson TB, Boxall K, Jones K, Linardopoulos S, Workman P, Aherne W, Lord CJ, Ashworth A. 2008. A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D. *Oncogene*, 27(8):1036-1044.
- Rieken S, Mohr A, Habermehl D, Welzel T, Lindel K, Witt O, Kulozik AE, Wick W, Debus J, Combs SE. 2011. Outcome and prognostic factors of radiation therapy for medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(3):e7-e13.



- Riojas MA, Guo M, Glöckner SC, Machida EO, Baylin SB, Ahuja N. 2007. Methylation-induced Silencing of ASC/TMS1, a Pro-Apoptotic Gene, is a Late-Stage Event in Colorectal Cancer. *Cancer Biol Ther*, 6(11):1710-1716.
- Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, Phoenix TN, Hedlund E, Wei L, Zhu X, Chalhoub N, Baker SJ, Huether R, Kriwacki R, Curley N, Thiruvengadam R, Wang J, Wu G, Rusch M, Hong X, Becksfort J, Gupta P, Ma J, Easton J, Vadodaria B, Onar-Thomas A, Lin T, Li S, Pounds S, Paugh S, Zhao D, Kawauchi D, Roussel MF, Finkelstein D, Ellison DW, Lau CC, Bouffet E, Hassall T, Gururangan S, Cohn R, Fulton RS, Fulton LL, Dooling DJ, Ochoa K, Gajjar A, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Gilbertson RJ. 2012. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *488(7409):43-48*.
- Rood BR, Zhang H, Cogen PH. 2004. Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma. *Neuro Oncol*, 6(3):200-207.
- Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ, Low JA. 2009. Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med*, 361(12):1173-1178.
- Savelyeva L, Schwab M. 2001. Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Lett*, 167(2):115-123.
- Schouten J, McElgunn C, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30(12):e57.
- Schouten J *et al.* 2008. MLPA DNA Detection Quantification Protocol. Version 18, MRC-Holland.
- Schouten J *et al.* 2008. MS-MLPA DNA Methylation Quantification Protocol. Version 13, MRC-Holland.
- Schwab M. 1999. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*, 9(4):319-25.

Scott RH, Mansour S, Pritchard-Jones K, Kumar D, MacSweeney F, Rahman N. 2007. Medulloblastoma, acute myelocytic leukemia and colonic carcinomas in a child with biallelic MSH6 mutations. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(2):130-134.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. 2004. Large-Scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome. *Science*, 305(5683):525-528.

Shedlock AM, Haygood MG, Pietsch TW, Bentzen P. 1997. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *BioTechniques*, 22(3):394-400.

Sherr CJ. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2):235-246.

Son EI, Kim IM, Kim DW, Yim MB, Kang YN, Lee SS, Kwon KY, Suh SI, Kwon TK, Lee JJ, Kim DS, Kim SP. 2003. Immunohistochemical analysis for histopathological subtypes in pediatric medulloblastomas. *Pathol Int*, 53(2):67-73.

Stone AR, Bobo W, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG, Vertino PM. 2004. Aberrant Methylation and Down-Regulation of TMS1/ASC in Human Glioblastoma. *American J of Pathol*, 165(4):1151-1161.

Tamandani DM, Sobti RC, Shekari M, Huria A. 2009. CpG Island Methylation of TMS1/ASC and CASP8 Genes in Cervical Cancer. *Eur J Med Res*, 14(2):71-75.

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*, 123(4):465-472.

Teixeira MR. 2002. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer*, 38(12):1580-1584.

Tomlinson IPM, Lambros MBK, Roylance RR. 2002. Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed? *Genes, Chromosomes & Cancer*, 34(4):349-353.

van Dijk MC, Rombout PD, Boots-Sprenger SH, Straatman H, Bernsen MR, Ruiter DJ, Jeuken JW. 2005. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed tissue. *Diagn Mol Pathol*, 14(1):9-16.

Véronèse L, Tournilhac O, Combes P, Prie N, Pierre-Eymard E, Guièze R, Veyrat-Masson R, Bay JO, Vago P, Tchirkoy A. 2013. Contribution of MLPA to routine diagnostic testing of recurrent genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet*, doi:10.1016/j.cancergen.2012.12.002.

Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araújo B, Seruca R, Pimentel J, Reis RM. 2009. Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma. *Neuro Oncol*, 11(5):458-467.

von Bueren AO, Bacolod MD, Hagel C, Heinemann K, Fedier A, Kordes U, Pietsch T, Koster J, Grotzer MA, Friedmann HS, Marra G, Kool M, Rutkowski S. 2012. Mismatch repair deficiency: a temozolomide resistance factor in medulloblastoma cell lines that is uncommon in primary medulloblastoma tumours. *British J of Cancer*, 107:1399-1408.

Wang H, Wang H, Zhang W, Fuller GN. 2006. Overexpression of IGFBP5, but not IGFBP3, correlates with the histologic grade of human diffuse glioma: a tissue microarray and immunohistochemical study. *Technol Cancer Res Treat*, 5(3):195-199.

Weiss MM, Hermsen MAJA, Meijer GA, van Grieken NCT, Baak JPA, Kuipers EJ, van Diest PJ. 1999. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol*, 52(5):243-251.

Weiß C. 2010. Basiswissen Medizinische Statistik. Fünfte Aufl. Berlin: Springer-Verlag.

Wong KK, deLeeuw RJ. 2007. A comprehensive analysis of common copynumber variations in the human genome. *Am J Hum Genet*, 80(1):91-104.

Yamamoto H, Ochiya T, Takahama Y, Ishii Y, Osumi N, Sakamoto H, Terada M. 2000. Detection of spatial localization of Hst-1/Fgf-4 gene expression in brain and testis from adult mice. *Oncogene*, 19(33):3805-3810.

Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, Louis DN. 2009. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res*, 15(14):4622-4629.

- Yoshida T, Ishimaru K, Sakamoto H, Yokota J, Hirohashi S, Igarashi K, Sudo K, Terada M. 1994. Angiogenetic activity of the recombinant hst-1 protein. *Cancer Lett*, 83:261-268.
- Yoshimoto M, Bayani J, Nuin PA, Silva NS, Cavalleiro S, Stavale JN, Andrade JA, Zielenska M, Squire JA, de Toledo SR. 2006. Metaphase and array comparative genomic hybridization: unique copy number changes and gene amplification of medulloblastomas in South America. *Cancer Genet Cytogenet*, 170(1):40-47.
- Zhang X, Kim J, Ruthazer R, McDevitt MA, Wazer DE, Paulson KE, Yee AS. 2006. The HBP1 transcriptional repressor participates in RAS-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*, 26(22):8252-8266.
- Zheng HT, Peng ZH, Li S, He L. 2005. Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. *World J Gastroenterol*, 11(43):6740-6744.
- Zheng R, Blobel GA. 2010. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer*, (12):1178-88.
- Zumkeller W. 2002. IGFs and IGF-binding proteins as diagnostic markers and biological modulators in brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn*, 2(5):473-477.

## 8 Anhang

Votum der Ethikkommission

Übersicht analysierter Gene

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

## Votum der Ethikkommission



**Universitätsklinikum  
Jena**

### Ethik-Kommission

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Dagmar Barz  
Geschäftsstelle: Dr. phil. Ulrike Skorsetz

Bachstraße 18  
07743 Jena

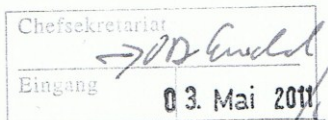
Telefon 03641 93 37 70  
Telefax 03641 93 37 71

E-Mail: [ethikkommission@med.uni-jena.de](mailto:ethikkommission@med.uni-jena.de)

2. Mai 2011

Universitätsklinikum Jena · Ethik-Kommission · Postfach · 07740 Jena

Prof. Dr. med. R. Kalff  
Klinik für Neurochirurgie  
UKJ  
Erlanger Allee 101  
07740 Jena



**Bearbeitungsnummer: 3081-03/11 (Bitte immer angeben)**

*Genetische Charakterisierung von Medulloblastomzellen*

Sehr geehrter Professor Kalff,

hiermit bestätigen wir den Eingang und die Kenntnisnahme des Schreibens von OA Dr. Herbold.  
Damit sind unsere Fragen beantwortet.

Das Studienvorhaben wird zustimmend bewertet. Es bestehen keine ethischen Bedenken.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. D. Barz  
Vorsitzende der Ethik-Kommission  
(i. A. Dr. U. Skorsetz)

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00  
Internet: [www.uniklinikum-jena.de](http://www.uniklinikum-jena.de)  
Gerichtsstand Jena  
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777  
Bankverbindung:  
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts  
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel  
Medizinischer Vorstand  
und Sprecher des Klinikumsvorstandes: Prof. Dr. Klaus Höffken  
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf  
Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem

## Übersicht analysierter Gene

| Gen          | Erläuterung   | Funktion                 |
|--------------|---|--------------------------|
| Kontrollgene |   |                          |
| AI651963     | <i>Hypothetical LOC254312</i>   | Wachstumsregulation      |
| CASR         | <i>Calcium-sensing receptor</i>   | Kalziumregulation        |
| CDK6         | <i>Cyclin-dependent kinase 6</i>  | Zellzyklusregulation     |
| CREM         | <i>CAMP responsive element modulator</i>  | Transkriptionsregulation |
| IL2          | <i>Interleukin-2</i>  | Zellabwehr               |
| PAH          | <i>Phenylalanine hydroxylase</i>  | Transkriptionsregulation |
| PARK2        | <i>Parkinson protein 2</i>  | Transkriptionsregulation |
| PMP22        | <i>Peripheral myelin protein 22</i>   | Wachstumsregulation      |
| TNFRSF1A     | <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>   | Zellabwehr               |
| TNXB         | <i>Tenascin XB</i>  | Zelladhäsionsinhibition  |
| Onkogene     |   |                          |
| BCL2         | <i>B-cell lymphoma 2</i>  | Apoptoseinhibition       |
| CTNNB1       | <i>Catenin (cadherin-associated protein) beta 1</i>   | Signaltransduktion       |
| FGF4         | <i>Fibroblast growth factor 4</i>   | Wachstumsregulation      |
| IGF1R        | <i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>  | Wachstumsregulation      |
| IGFBP        | <i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>   | Wachstumsregulation      |
| IRS2         | <i>Insulin receptor substrate 2</i>   | Hormonregulation         |
| JAK2         | <i>Janus kinase 2</i>   | Signaltransduktion       |
| KLK3         | <i>Kallikrein-related peptidase 3</i>   | Wachstumsregulation      |
| NFKBIE       | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor epsilon</i> | Signaltransduktion       |
| NRAS         | <i>Neuroblastoma RAS</i>  | DNA-Reparatur            |
| NTRK1        | <i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>   | Zelldifferenzierung      |
| PDGFRA       | <i>Platelet-derived growth factor receptor alpha polypeptide</i>                            | Wachstumsregulation      |
| PIK3C2B      | <i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing beta polypeptide</i>      | Zellzyklusregulation     |
| PIK3CA       | <i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>                              | Zellzyklusregulation     |
| PPM1D        | <i>Protein phosphatase Mg<sup>2+</sup>-dependent 1δ</i>                                     | Zellzyklusregulation     |

| Gen                 | Erläuterung  | Funktion                  |
|---------------------|--|---------------------------|
| Onkogene            |  |                           |
| RUNX1               | <i>Runt-related transcription factor 1</i>                       | Wachstumsregulation       |
| SERPINB             | <i>Serpin peptidase inhibitor</i>                                | Fibrinolyseinhibitor      |
| TOM1L2              | <i>Target of myb1-like 2</i>                                     | Wachstumsregulation       |
| Protoonkogene       |  |                           |
| BCL2L11             | <i>Bcl-2-like 11</i>   | Apoptosevermittlung       |
| BIRC5               | <i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>                       | Apoptoseresistenz         |
| BRAF                | <i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>                     | Wachstumsregulation       |
| CYP27B1             | <i>Cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1</i>    | Wachstumsregulation       |
| ERBB                | <i>Erythroblastic leukaemia viral oncogene homolog</i>           | Wachstumsregulation       |
| Tumorsuppressorgene |  |                           |
| APC                 | <i>Adenomatous polyposis coli</i>                                | Signaltransduktion        |
| ASC                 | <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> | Apoptosevermittlung       |
| ATM                 | <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>                             | DNA-Reparatur             |
| BRCA                | <i>Breast cancer</i>   | DNA-Reparatur             |
| CASP8               | <i>Cysteine-aspartic acid protease 8</i>                         | Apoptoseinduktion         |
| CD44                | <i>Cluster of differentiation</i>                                | Zelladhäsion              |
| CDH                 | <i>Cadherin</i>  | Zelladhäsion              |
| CDKN                | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>                         | Zellzyklusregulation      |
| CHFR                | <i>E3 ubiquitin-protein ligase</i>                               | Zellzyklusregulation      |
| DAPK1               | <i>Death-associated protein kinase 1</i>                         | Apoptoseregulation        |
| ESR1                | <i>Estrogen receptor 1</i>                                       | Hormonregulation          |
| FHIT                | <i>Fragile histidine triad</i>                                   | Purinmetabolismus         |
| GATA5               | <i>GATA binding protein 5</i>                                    | Wachstumsregulation       |
| GSTP1               | <i>Glutathione S-transferase P 1</i>                             | Detoxifikationsregulation |
| HIC1                | <i>Hypermethylated in cancer 1</i>                               | Wachstumsregulation       |
| IGSF4               | <i>Immunoglobulin superfamily 4</i>                              | Zelladhäsion              |
| MGMT                | <i>O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase</i>         | DNA-Reparatur             |
| MLH                 | <i>MutL homolog</i>  | DNA-Reparatur             |



| Gen                 | Erläuterung   | Funktion                 |
|---------------------|---|--------------------------|
| Tumorsuppressorgene |   |                          |
| MSH6                | <i>MutS homolog 6</i>                               | DNA-Reparatur            |
| PAX5A               | <i>Paired box 5A transcription factor</i>           | Zellabwehr               |
| PTEN                | <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>               | Signaltransduktion       |
| PTCH                | <i>Protein patched homolog</i>                      | Signaltransduktion       |
| RARB                | <i>Retinoic acid receptor beta</i>                  | Wachstumsregulation      |
| RASSF1A             | <i>Ras association domain-containing protein 1A</i> | DNA-Reparatur            |
| RB1                 | <i>Retinoblastoma 1</i>                             | Zellzyklusregulation     |
| THBS1               | <i>Thrombospondin 1</i>                             | Zelladhäsion             |
| TIMP3               | <i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>                | Extrazellulärmechanismen |
| TP53                | <i>Tumor protein p53</i>                            | DNA-Reparatur            |
| TP73                | <i>Tumor protein p73</i>                            | DNA-Reparatur            |
| TSC2                | <i>Tuberous sclerosis 2</i>                         | Wachstumsregulation      |
| VHL                 | <i>Von Hippel-Lindau</i>                            | Zellzyklusregulation     |
| WT1                 | <i>Wilm's tumour tumor suppressor gene 1</i>        | Transkriptionsregulation |

## Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Kalff und PD Dr. med. habil. Ch. Ewald der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Jena für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die Betreuung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit bedanken. Auch Dr. med. J. Walter aus gleichnamiger Klinik erwies sich zu jeder Zeit als zuverlässiger Ansprechpartner und bot Hilfestellung bei der schriftlichen Fixierung der Dissertation.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Ch. Beetz aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Jena nennen, der mich während meiner experimentellen Forschungsarbeit unterstützte.

Nicht zuletzt meinen Eltern gebührt großer Dank für die liebevolle Unterstützung während meiner Studienzeit und den Monaten der Anfertigung dieser Dissertationsschrift.

Jena, 16.12.2013

Denise Feierabend

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel  
aufheben, während sich der weite Ozean des  
Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“*

Isaac Newton (1642 - 1726)

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. R. Kalff

PD Dr. med. habil. Ch. Ewald

PD Dr. med. B. F.M. Romeike

Dr. med. J. Walter

Dr. rer. nat. Ch. Beetz

Dr. rer. nat. M. Walther,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei anderen Hochschulen als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 16.12.2013

Denise Feierabend